

2º Ciclo
Mestrado em Alimentação Coletiva

Avaliação da qualidade e da segurança microbiológica da ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*) e do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*)

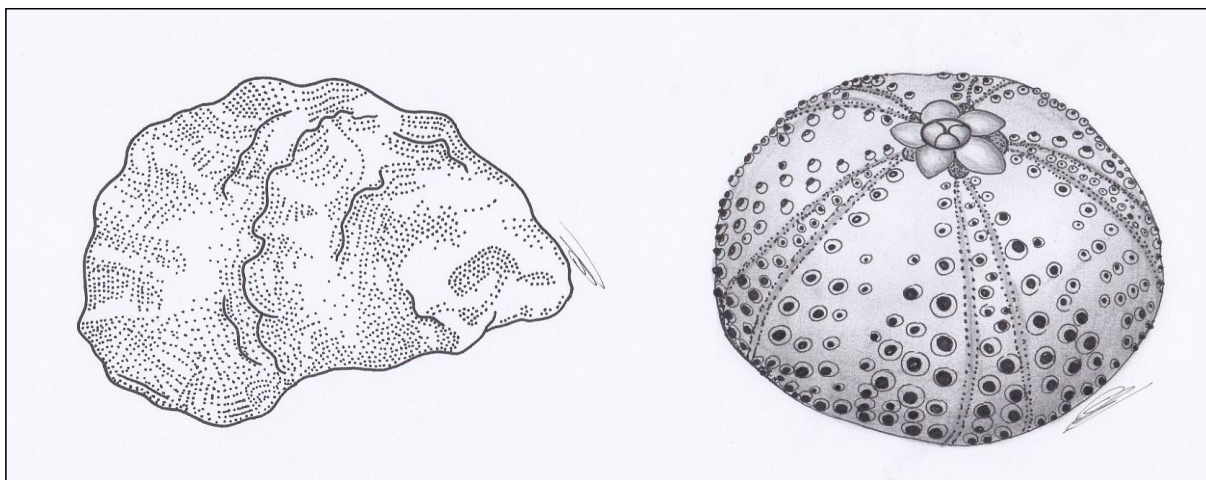
Carla Rafaela Chiquelho da Silva



2017



**Avaliação da qualidade e da segurança microbiológica da
ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*) e do ouriço-do-mar
(*Paracentrotus lividus*)**



CARLA RAFAELA CHIQUELHO DA SILVA

Porto, 2017

Avaliação da qualidade e da segurança microbiológica da ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*) e do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*)

Evaluation of the microbiological quality and safety of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*)

Carla Rafaela Chiquelho da Silva

Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Rua Dr. Roberto Frias

4200-465 PORTO

Portugal

Telefone: +351 225 074 320

Fax: +351 225 074 329

Reproduções parciais deste documento serão autorizadas na condição que seja mencionado o Autor e feita referência ao *Mestrado em Alimentação Coletiva 2016/2017 - Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2017*.

As opiniões e informações incluídas neste documento representam unicamente o ponto de vista do respetivo Autor, não podendo o Editor aceitar qualquer responsabilidade legal ou outra em relação a erros ou omissões que possam existir.

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Alimentação Coletiva apresentada à Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto.

2017

Investigação realizada no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto no Laboratório de Microbiologia e de Tecnologia Alimentar do Departamento de Produção Aquática.

Orientadora: Doutora Ângela S. Inácio

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Coorientador: Professor Doutor Paulo Martins da Costa

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Coorientador: Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Vaz Pires

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projeto Estruturado de I&D&I INNOVMAR - *Innovation and Sustainability in the Management and Exploitation of Marine Resources* (reference NORTE-01-0145-FEDER-000035) dentro da linha INSEAFOOD, “*Innovation and Valorization of Seafood Products: Meeting Local Challenges and Opportunities*”, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).”



Este foi efetuado pelo Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) em parceria com o Laboratório de Microbiologia e Tecnologia Alimentar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.



À minha querida Família,

"A saúde do nosso planeta e a nossa própria saúde
dependem da maneira como lidamos com o mundo azul"

José Graziano da Silva (Diretor-Geral da FAO)

Agradecimentos

Agradeço à Doutora Ângela Inácio pela incansável orientação desta dissertação, sempre disponível com um inconformismo presente, em busca de novas soluções mais inovadoras, que constituíram um estímulo e interesse para a execução deste trabalho. A compreensão, paciência, ensinamentos e colaboração evidenciadas ao longo deste último desafio, assim como um profundo conhecimento científico e uma postura de rigor, em muito contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e valorização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Martins da Costa por me ter aceitado no Laboratório de Microbiologia e Tecnologia Alimentar e por me proporcionar a participação no projeto INSEAFOOD. Expresso um profundo agradecimento por toda a ajuda, paciência, conselhos, ensinamentos e por toda a compreensão que sempre demonstrou desde o primeiro momento.

Ao Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Vaz-Pires, que me acompanha desde a licenciatura e o qual considero meu mentor nesta jornada académica, agradeço a simpatia, a disponibilidade dos meios que me forneceu para a realização do estágio, pelo constante incentivo, pela ajuda e pela boa disposição contagiante. Agradeço os cruciais ensinamentos e conselhos que me proporcionou ao longo destes anos.

O meu bem-haja à Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e a todos os docentes que conheci durante todo o meu percurso académico e que em muito cooperaram para a minha formação.

Um especial agradecimento aos meus queridos e adorados Pais, que desde sempre fizeram tudo o que podiam e o que não podiam para ver-me feliz e concretizada e que sempre valorizaram a minha educação e formação académica. Agradeço com carinho todo o amor e apoio sistemático na vida e os ensinamentos que fazem de mim o que sou hoje.

À minha irmã, Gabriela, pelo amor e pela paciência que teve comigo nos últimos tempos. Apesar da diferença de idades sei que é capaz de fazer tudo para me proteger e ver-me bem.

Ao Eduardo, por todo o carinho, afeto e sentimentos partilhados. Meu melhor amigo e a melhor pessoa que podia ter a meu lado, agradeço todo o respeito, apoio incondicional, força constante e ainda a

paciência e a compreensão que demonstrou ter durante este período. Pela sua sabedoria, conselhos, boa disposição e brincadeiras ao longo dos últimos anos.

O meu reconhecimento à Daniela e à Nânci, muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, disponibilidade e cooperação desde o início até ao fim desta etapa.

À Lousie, à Joana e ao Luís, os meus companheiros estagiários, agradeço as gargalhadas dadas, os momentos de descontração e toda a ajuda e disponibilidade que demonstraram quando eu me sentia assoberbada.

À D. Elisabete e à Sónia que me ajudaram sempre que precisei nos momentos mais difíceis, expresso, igualmente, o meu agradecimento.

A todas as amigas que mantenho e que jamais irão cair no esquecimento, expresso o meu sincero agradecimento pelo apoio e incentivo demonstrado e pela compreensão dos momentos em que estive ausente em prol da realização deste trabalho.

Agradeço também ao Programa Norte 2020, o qual apoiou financeiramente o Projeto INSEAFOOD, agradeço o interesse e a confiança demonstrada em apostar na ciência.

Uma menção especial ao CIIMAR e ao Departamento de Produção Aquática do ICBAS, principalmente ao Laboratório de Microbiologia e Tecnologia Alimentar do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto pelo apoio e pela oportunidade proporcionada.

Grata a todas as personalidades, instituições e organizações que tenham a qualquer título, oferecido algum tipo de apoio ao projeto e, por consequência, à realização deste trabalho.

Resumo

Portugal possui uma grande tradição e qualidade na oferta de marisco. A estratégia empresarial neste sector do mercado aposta não só na distribuição a nível nacional, mas também na exportação para outros países, como Espanha, França e Japão. O mercado francês, líder no comércio das ostras na Europa e detentor do mais alto consumo *per capita* de ostras cruas (2 kg) em todo o mundo, importa cerca de 90% da produção de ostras portuguesas. Já a comercialização e exportação de equinodermes sofreu um grande aumento nos últimos 20 anos, na medida em que o Japão utiliza o ouriço-do-mar como uma iguaria de excelência nas confeções de sushi, importando cerca de 97 % dos ouriços mundialmente comercializados.

O consumo de produtos *in natura* acarreta um grande perigo para a saúde pública, pelo que no presente estudo foi feita uma avaliação integrada da higiene e da segurança microbiológica ao nível da produção primária de ostras (*Crassostrea gigas*), provenientes de uma aquacultura no Canal de Mira, e de ouriços-do-mar (*Paracentrotus lividus*), provenientes das praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo. Neste trabalho foi também avaliada a qualidade microbiológica das águas onde cada espécie habita. Foram realizadas quatro amostragens sazonais, correspondentes a cada estação do ano (verão, outono, inverno e primavera), durante as quais se recolheu um total de 104 ostras e 119 ouriços-do-mar, ou seja, em cada amostragem foram recolhidos cerca de 20 a 35 ostras e 10 a 20 ouriços. A escolha da data das amostragens sazonais foi feita em função das marés de cada local e de forma a abranger as quatro estações do ano.

Ao longo de todas as amostragens, procedeu-se à avaliação de alguns parâmetros biométricos antes da avaliação microbiológica de todas as amostras em conformidade com a legislação, as normas e os procedimentos internos do laboratório para parâmetros não convencionais.

Para a análise microbiológica obteve-se o biofilme superficial e o conteúdo edível de ambas as espécies, seguindo-se a hemolinfa e o líquido intravalvar, no caso das ostras e do líquido celómico dos ouriços. Desta forma, efetuou-se a deteção e a enumeração de *Escherichia coli* e enterococcus, indicadores de qualidade e organismos patogénicos e realizou-se a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* tanto na água como no conteúdo edível.

Apesar de se ter detetado a presença *Samonella* spp. nas águas conquícolas amostradas e na Praia Norte, não se detetou a presença da bactéria em qualquer das amostras de biofilme superficial das ostras e dos ouriços, nem em qualquer das amostras recolhidas nos compartimentos e tecidos edíveis e não edíveis. Também não se detetou *Listeria monocytogenes* em qualquer das amostras de ouriços e ostras.

Com base no Regulamento (CE) nº 2073 /2005, constatou-se que todas as amostras de ostras e ouriços recolhidas devem ser consideradas satisfatórias. É importante sublinhar que, no caso particular das

ostras, estes requisitos foram cumpridos antes da depuração e, portanto, antes de se encontrarem prontas a serem colocadas no mercado, conforme estabelecido pela legislação. Adicionalmente, os valores obtidos na quantificação de *E. coli* são compatíveis com os exigidos às ostras oriundas de zonas de produção da classe A, atestando que ao nível da produção primária, o produtor de ostras cumpre as disposições gerais de higiene aplicáveis à produção primária. Verifica-se também que as ostras analisadas neste trabalho apresentaram níveis de contaminação inferiores à média dos controlos oficiais publicitados pelo IPMA no âmbito do plano de ação “Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves”.

Após a verificação e confirmação dos resultados através de provas bioquímicas, procedeu-se ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos, onde se observou uma baixa prevalência de perfis de resistência de isolados de *Escherichia coli* e de *Enterococcus* spp. provenientes das amostras tanto de ostras como de ouriços-do-mar.

PALAVRAS-CHAVE: Segurança alimentar, Consumo de marisco cru, *Crassostrea gigas*, *Paracentrotus lividus*

Abstract

Portugal has a great tradition of quality seafood. The business strategy in this sector of the market focuses not only on the distribution at national level, but also on exports to other countries, such as Spain, France and Japan. The French market, leader in the oyster trade in Europe and holder of the highest consumption rate per capita of raw oysters (2 kg) worldwide, imports about 90% of the Portuguese oyster production. On the other hand, the commercialization and export of echinoderms has dramatically increased in the last 20 years as Japan uses sea urchin as a delicacy of sushi confection, importing about 97% of the world's commercialized sea urchins.

The consumption of *in natura* products poses a great danger to public health. Thus, in the present study an integrated assessment of hygiene and microbiological safety at the level of the primary production of oysters (*Crassostrea gigas*) from an aquaculture in the Canal de Mira, and sea urchins (*Paracentrotus lividus*), from Carreço's beach and Norte's beach in Viana do Castelo was performed. The microbiological quality of the water where each species inhabits was also evaluated. Four seasonal samplings, corresponding to each season of the year (Summer, Autumn, Winter and Spring), were carried out during which a total of 104 oysters and 119 sea urchins were collected. For each sampling about 20 to 35 oysters and 10 to 20 sea urchins were collected. The choice of the date of the seasonal samplings was made according to the tides of each place and to cover the four seasons of the year.

Throughout the samplings, some biometric parameters were studied before the microbiological analyses of the samples, which were performed in accordance with the current legislation, the international standards and with internal procedures used to evaluate non-conventional parameters.

For the microbiological analysis, the superficial biofilm and the edible content of both species were obtained, followed by hemolymph and intravalvar liquid, in the case of oysters and the coelomic liquid of the sea urchins. The detection and enumeration of *Escherichia coli* and enterococcus, quality indicators and pathogenic organisms was carried out and the research of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*.

Despite the presence of *Salmonella* spp. in the water samples, this bacterium was not detected in any of the superficial biofilm samples of oysters and sea urchins, nor in any of the samples collected in edible and non-edible compartments and tissues.

Listeria monocytogenes was also not detected in any of the urchin and oyster samples analyzed. In accordance with the Regulation (EC) No 2073/2005 it was found that all samples of oysters and sea urchins collected should be considered satisfactory for consumption. It is important to note that in the case of oysters, these requirements were fulfilled prior to depuration as required by the legislation and thus before they were ready to be placed on the market. In addition, the values obtained for the quantification of *E. coli* are compatible with those required for oysters from Class A

production areas, attesting that at the level of primary production the oyster producer complies with the general hygiene provisions applicable to primary production. It was also verified that the oysters analyzed in this study presented levels of contamination lower than the average of the official controls publicized by the IPMA under the “National Bivalve Mollusc Monitoring System” action plan.

After the verification and confirmation of the results through biochemical tests, the antimicrobial susceptibility test was carried out, where it was verified a low prevalence of resistance profiles of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from oysters and sea urchins.

KEYWORDS: Food safety, Raw seafood consumption, *Crassostrea gigas*, *Paracentrotus lividus*

Símbolos, Acrónimos e Abreviaturas

ABR: Antibiorresistência

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMC: Amoxicilina/ácido clavulânico,

AMK: Amicacina

AMP: Ampicilina

APT: Água peptonada tamponada

ASAE: Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ASP: *Amnesic shellfish poisoning*

ATM: Aztreonam

BP: *Baird-Parker Agar*

CAZ: Ceftazidima

CDC: *Center for Disease Control*

CEF: Cefalotina

CHL: Cloranfenicol

CIIMAR: Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

CIP: Ciprofloxacina

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTX: Cefotaxima

CV: Coeficiente de variação

DGRM: Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos

DHA: Ácido docosahexaenóico

DOX: Doxiciclina

DSP: *Diarrhetic shellfish poisoning*

EPA: Ácido eicosapentaenóico

ERY: Eritromicina

ESBL: *Extended-spectrum beta-lactamase*

ETAR: Estações de Tratamento de Águas Residuais

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FOF: Fosfomicina

FOX: Cefoxitina

GEN: Gentamicina

HEK: *Hektoen enteric agar*

IMP: Imipenema

IPMA: Instituto Português do Mar e da Atmosfera

ISO: *International Organization for Standardization*

KAA: *Agar Kanamicin-esculin Azida*

LS: Lactose sulfito

LZD: Linezolida

MDR: multirresistente

MKTTn: *Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocina*

MSRV: *Rappaport-Vassiliadis medium semisolid modified*

NAL: Ácido nalidíxico

NIT: Nitrofurantoína

NMP: Número mais provável

NP: Norma portuguesa

OCP: Pesticidas organoclorados

OGA: *Oxytetracycline Glucose Agar*

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCA: *Plate Count Agar*

PCB: Bifenilos policlorados

PEN: Penicilina

POP: Poluentes orgânicos persistentes

PSP: *Paralytic shellfish poisoning*

PUFA: Ácido gordo polinsaturado

Q-D: Quinupristina/dalfopristina

RIF: Rifampicina

SB: *Slanetz and Bartley*

SPS: *Sanitary and Phytosanitary*

STR: Estreptomicina

SXT: Trimetoprima/sulfametoxazole

TBX: *Tryptone Bile X-glucuronide*

TEC: Teicoplanina

TET: Tetraciclina

TOB: Tobramicina

TSC: *Tryptose Sulphide Cycloserine*
TTC: *Triphenyltetrazolium chloride*
UFC: Unidade formadoras de colónias
UV: Ultravioleta
VAN: Vancomicina
VRBG: *Violet Red Bile Glucose Agar*
ZEE: Zona Económica Exclusiva
ZPB: Zona de produção de bivalves

Índice geral

Resumo.....	XII
Abstract	XV
1. Introdução.....	29
1.1. Restauração coletiva e segurança alimentar	31
1.2. Consumo de pescado	33
1.2.1. Atividade da pesca	33
1.2.2. Aquacultura	34
1.2.3. Composição e valor nutricional do pescado	35
1.2.4. Segurança e qualidade do pescado	36
1.2.5. Qualidade da água	37
1.2.6. Perigos associados.....	37
1.3. Caracterização das espécies em estudo.....	46
1.3.1. Ostra-do-Pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)	46
1.3.1.1. Importância e comercialização	47
1.3.1.2. Monitorização Ambiental.....	49
1.3.1.3. Depuração	50
1.3.2. Ouriço-do-mar (<i>Paracentrotus lividus</i>).....	54
1.3.2.1. Importância e comercialização	55
1.4. Resistência a antimicrobianos.....	58
2. Objetivos	61
3. Material e métodos	64
3.1. Caracterização das zonas de amostragem e colheita das amostras	65
3.1.1. Ostra-do-Pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>).....	65

3.1.1.1. Canal de Mira	65
3.1.1.2. Procedimento de amostragem	66
3.1.1.3. Parâmetros biométricos	66
3.1.2. Ouriço-do-mar (<i>Paracentrotus lividus</i>)	66
3.1.2.1. Praia de Carreço	67
3.1.2.2. Praia Norte	67
3.1.2.3. Procedimento de amostragem	68
3.1.2.4. Parâmetros biométricos	68
3.2. Preparação das amostras	68
3.2.1. Ostra-do-Pacífico	68
3.2.2. Ouriço-do-mar	70
3.2.3. Coluna de água	72
3.3. Análise da qualidade e segurança microbiológica	72
3.3.1. Análise microbiológica alimentar	72
3.4. Análise microbiológica do habitat, do biofilme superficial e dos fluidos orgânicos	77
3.4.1. Biofilme superficial, líquido intravalvar, hemolinfa e líquido celómico	77
3.4.2. Conteúdo edível	78
3.4.3. Coluna de água	79
3.5. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	80
3.5.1. Antibiógramas	80
3.5.2. Classificação de bactérias multirresistentes	80
4. Resultados e discussão	84
4.1. Caracterização das amostras	85
4.1.1. Ostra-do-Pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)	85
4.1.2. Ouriço-do-mar (<i>Paracentrotus lividus</i>)	86
4.2. Análise microbiológica alimentar-conteúdo edível	87

4.3. Análise microbiológica do habitat, do biofilme superficial e dos fluidos orgânicos	99
4.3.1. Ostra-do-Pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)	99
4.3.1.1. Águas das zonas de produção	99
4.3.1.2. Biofilme superficial.....	102
4.3.1.3. Líquido intravalvar.....	104
4.3.1.4. Hemolinfa	105
4.3.2. Ouriço-do-mar (<i>Paracentrotus lividus</i>).....	109
4.3.2.1.Água do mar	109
4.3.2.2. Biofilme superficial.....	111
4.3.2.3.Líquido celómico	112
4.4. Resistência aos antimicrobianos	116
5. Conclusão	123
5.1.Apreciação global	124
5.2. Conclusões do estudo	125
6. Referências bibliográficas	129
7. Anexos	141

Índice de figuras

Figura 1.1: Consumo de pescado <i>per capita</i> na União Europeia.	33
Figura 1.2: Produção mundial de pescado por captura e por produção aquícola.	34
Figura 1.3: Modo de transmissão de vírus entéricos.	41
Figura 1.4: Exterior de <i>C.gigas</i> (adaptado).	46
Figura 1.5: Interior de <i>C. gigas</i> .	46
Figura 1.6: Anatomia interna de <i>C. gigas</i> (adaptado).	47
Figura 1.7: Produção aquícola global de <i>C. gigas</i> em toneladas (adaptado).	49
Figura 1.8: Resumo das etapas, procedimentos e requisitos necessários para a colocação de ostras e equinodermes no mercado (para consumo humano). Esquema elaborado conforme os preceitos inscritos no Regulamento (CE) nº 852/2004, Regulamento (CE) nº 853/2004, Regulamento (CE) nº 854/2004 e Regulamento (CE) nº 2073 /2005.	53
Figura 1.9: Parte superior de <i>P. lividus</i> .	54
Figura 1.10: Parte inferior de <i>P. lividus</i> .	54
Figura 1.11: Anatomia interna de ouriço-do-mar.	55
Figura 1.12: Representação gráfica dos fluxos de disseminação de bactérias entre os ambientes terrestre e aquático.	59
Figura 3.1: Localização do ponto de amostragem na zona de produção das ostras da empresa Bivaqua no Canal de Mira (Ílhavo).	65
Figura 3.2: Localização dos pontos de amostragem dos ouriços na costa norte de Portugal: Praia de Carreço (a norte) e Praia Norte (a sul).	67
Figura 3.3: Protocolo utilizado no processamento e monitorização microbiológica das amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	69
Figura 3.4: Protocolo utilizado no processamento e monitorização microbiológica das amostras recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	70
Figura 3.5: Processamento das amostras de ouriço-do-mar.	72
Figura 3.6: Microrganismos estudados em diferentes meios de cultura.	76
Figura 4.1: Variação sazonal da contaminação por <i>E. coli</i> nas amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	90
Figura 4.2: Variação sazonal da contaminação por <i>E. coli</i> em amostras de ostras recolhidas em diferentes zonas de produção de bivalves em Portugal.	91
Figura 4.3: Variação sazonal da contaminação por <i>E. coli</i> em amostras de bivalves recolhidas na Ria de Aveiro.	92
Figura 4.4: Variação sazonal na quantidade de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes na carne e líquido intravalvar (conteúdo edível) das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	95

Figura 4.5: Variação sazonal na quantidade de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes nas gónadas (conteúdo edível) das amostras de ouriço-do-mar recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	95
Figura 4.6: Variação sazonal da quantidade de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas nas amostras de água recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	100
Figura 4.7: Variação sazonal do número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes no biofilme superficial das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	103
Figura 4.8: Variação sazonal no número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes no líquido intravalvar das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	104
Figura 4.9: Variação sazonal no número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes na hemolinfa das amostras de ostra-do-pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	105
Figura 4.10: Síntese dos resultados das análises realizadas a <i>C. gigas</i> .	108
Figura 4.11: Variação sazonal da quantidade de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas nas amostras de água recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	109
Figura 4.12: Variação sazonal do número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes no biofilme superficial das amostras de ouriço-do-mar recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	112
Figura 4.13: Variação sazonal do número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes no líquido celómico das amostras de ouriço-do-mar recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	112
Figura 4.14: Síntese dos resultados das análises realizadas a <i>P. lividus</i> da praia de Carreço.	114
Figura 4.15: Síntese dos resultados das análises realizadas a <i>P. lividus</i> da praia do Norte.	115
Figura 4.16: Prevalência da resistência aos antibióticos estudados nos isolados de <i>E. coli</i> recuperados a partir das amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	117
Figura 4.17: Prevalência da resistência aos antibióticos estudados nos isolados de <i>Enterococcus</i> spp. recuperados a partir das amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	117
Figura 4.18: Prevalência da resistência aos antibióticos estudados nos isolados de <i>E. coli</i> recuperados a partir das amostras recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	118
Figura 4.19: Prevalência da resistência aos antibióticos estudados nos isolados de <i>Enterococcus</i> spp. recuperados a partir das amostras recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	118
Figura 4.20: Antibiógramas de dois isolados de <i>E. coli</i> multirresistentes aos antimicrobianos obtidos a partir de amostras de água recolhidas na Praia Norte.	120

Índice de tabelas

Tabela 1.1: Composição nutricional de pescado.	36
Tabela 1.2: Sistema de classificação das ZPB.	50
Tabela 3.1: Plano das amostragens de ostra-do-Pacífico realizadas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	66
Tabela 3.2: Plano das amostragens de ouriço-do-mar realizadas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	68
Tabela 3.3: Testes bioquímicos para confirmação dos isolados de Enterobacteriaceae.	73
Tabela 3.4: Categorias de agentes antimicrobianos e antibióticos testados para classificar os isolados de <i>E. coli</i> como MDR.	81
Tabela 3.5: Categorias de agentes antimicrobianos e antibióticos testados para classificar os isolados de <i>Enterococcus</i> spp. como MDR.	82
Tabela 4.1: Variação sazonal dos parâmetros biométricos analisados nas amostras de ostra-do-pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	85
Tabela 4.2: Variação sazonal dos parâmetros biométricos analisados nas amostras de ouriço-do-mar recolhidos na Praia de Carreço em Viana do Castelo.	86
Tabela 4.3: Variação sazonal dos parâmetros biométricos analisados nas amostras de ouriço-do-mar recolhidos na Praia do Norte em Viana do Castelo.	87
Tabela 4.4: Análise microbiológica alimentar do conteúdo edível das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	94
Tabela 4.5: Análise microbiológica alimentar do conteúdo edível das amostras de ouriço-do-mar recolhidas na Praia de Carreço em Viana do Castelo.	97
Tabela 4.6: Análise microbiológica alimentar do conteúdo edível das amostras de ouriço-do-mar recolhidas na Praia Norte em Viana do Castelo.	98
Tabela 4.7: Monitorização microbiológica das amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	102
Tabela 4.8: Monitorização microbiológica das amostras recolhidas na Praia de Carreço em Viana do Castelo.	110
Tabela 4.9: Monitorização microbiológica das amostras recolhidas na Praia do Norte em Viana do Castelo.	111
Tabela 4.10: Caracterização das estirpes MDR presentes nas amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.	120
Tabela 4.11: Caracterização das estirpes MDR presentes nas amostras recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.	121

1 Introdução



Cortesia do Professor Paulo Vaz-Pires

1.1. Restauração coletiva e segurança alimentar

Conforme o *Codex Alimentarius* (1993) o termo “restauração coletiva” constitui toda a atividade capaz de integrar a preparação, armazenamento, entrega ou serviço de alimentos a um grande número de pessoas, podendo estes serem públicos ou privados, tendo como exemplo as cantinas escolares e os restaurantes respetivamente ⁽¹⁾.

Ao longo dos últimos anos, têm-se verificado várias alterações no setor da restauração coletiva, por exemplo, as mudanças dos hábitos alimentares e o tipo de alimentos consumidos. Segundo Baptista e Antunes (2005) há várias razões que o justificam, como o crescimento da população em meios urbanos, a distância e o tempo médio entre a residência e o local de trabalho e/ou escola, aumento do número de mulheres no mercado de trabalho e o aumento do poder de compra do consumidor ⁽²⁾. Estes fatores justificam o crescimento do setor da restauração, potenciando, igualmente, a evolução das suas técnicas de preparação, confeção, transporte, armazenamento e serviço. Com este crescimento, as empresas de restauração e de *catering* tentam, deste modo, providenciar ao consumidor alimentos não só com uma elevada qualidade como também alimentos nutritivos e seguros ⁽³⁾.

O conceito de segurança alimentar tem vindo a assumir um papel cada vez mais determinante nas escolhas alimentares da maioria dos consumidores e, ao mesmo tempo, tem vindo a revelar-se como uma das principais preocupações para as empresas deste setor. Enquanto numa visão mais primitiva a segurança alimentar era interpretada apenas como a disponibilidade de alimentos para garantir a sobrevivência do ser humano, hoje define-se como a “garantia de que os alimentos não provocarão danos ao consumidor quando preparados ou consumidos de acordo com a sua utilização prevista” ⁽⁴⁾.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), registam-se diariamente casos de doenças de origem alimentar em todos os países. De acordo com a definição do *Center for Disease Control* (CDC), nos Estados Unidos da América, uma doença de origem alimentar define-se como aquela que é transmitida por alimentos, habitualmente num incidente onde duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sintomas de doença, após terem ingerido um mesmo alimento, e as análises epidemiológicas apontem o alimento como a origem da doença ⁽²⁾. Estes problemas são já considerados uma das maiores causas de doença e morte a nível mundial e, conseqüentemente são identificadas como um importante e crescente problema de saúde pública e económico ⁽⁵⁾.

Vários estudos afirmam ainda que a prevalência deste tipo de surtos resulta de uma diversidade de fatores, entre os quais estão as alterações ambientais, a crescente industrialização, as atitudes e os

comportamentos dos produtores e manipuladores de alimentos e, ainda, toda a informação que é transmitida para o consumidor ^(6,7).

As investigações que são efetuadas a dados epidemiológicos sempre que ocorrem surtos de doenças de origem alimentar têm permitido concluir que, na maioria das vezes, os principais fatores de risco que contribuem para estas epidemias nos serviços de restauração estão diretamente relacionados com comportamentos inadequados do pessoal, desde a produção até ao consumidor final. Exemplos são as temperaturas de armazenamento impróprias, a confeção desajustada, os equipamentos de captura contaminados, a origem insegura dos alimentos e a higiene pessoal desapropriada ⁽⁸⁾.

Na verdade, a restauração coletiva surge como um elemento final da cadeia alimentar que faz ponte para o consumidor e, de certo modo, substitui-o na sua tarefa de preparar, confeccionar e conservar os alimentos. Assim, o consumidor está muito dependente da confiança dos métodos e dos cuidados que foram utilizados no processamento dos alimentos, imediatamente antes de estes chegarem ao seu prato. Se é imprescindível a exigência de garantias de segurança nos primeiros estágios da cadeia alimentar, a restauração coletiva torna-se uma etapa também importante do processo, já que nesta fase poder-se-ão comprometer todos os bons resultados obtidos previamente. Só a eficácia e os cuidados aplicados nesta fase permitem manter e garantir a confiança a jusante, permitindo o sucesso em toda a cadeia alimentar e cumprindo o objetivo da segurança alimentar para o consumidor.

Como já foi referido, o aumento do poder de compra do consumidor estimulou a procura por determinados serviços, para além dos comuns espaços de restauração coletiva, sendo exemplos os cruzeiros marítimos de curto, médio e longo curso.

De acordo com a Associação Internacional de Linhas de Cruzeiros (2017), o número de passageiros marítimos tem aumentado, na medida em que no ano de 2016 foi registado o transporte internacional em navios de cruzeiros de cerca de 24,7 milhões de passageiros, mais 6,4% do que o registado no ano anterior (23,2 milhões de passageiros) ⁽⁹⁾. Surgem também, de forma proporcional, o aumento de problemas com a prestação de serviços. Embora a maioria das vezes sejam tomadas as devidas precauções, muitas vezes são publicadas notícias referentes a viroses e intoxicações alimentares neste tipo de ambientes surgidos recentemente ^(10,11). A probabilidade de contrair uma doença de origem alimentar durante os cruzeiros marítimos é bastante alta, uma vez que há muitas pessoas confinadas no mesmo ambiente, que por vezes o abandonam e regressam, podendo originar contaminações. Por outro lado, motivos como a higiene e o manuseio insuficiente ou inadequado da tripulação que atua nas cozinhas e/ou que serve os clientes, a temperatura e o tempo de exposição dos alimentos nos *buffets* e o tipo de produtos alimentares servidos são fatores que contribuem, igualmente, para a proliferação das doenças em causa ⁽¹²⁾.

Rooney *et al.* (2004) ⁽¹⁰⁾ relataram que entre 1970 e 2003 foram referenciados surtos de doenças infecciosas associadas a navios de cruzeiro, nomeadamente surtos de *Legionella* spp., salmonelose, febre tifóide, *Escherichia coli*, shigelose, criptosporidiose, triquinose e gastroenterites virais transmitidas, por exemplo, pelo norovírus, conhecido como o “vírus de cruzeiro” e que é associado ao consumo de ostras cruas e de outros bivalves ^(13–15).

1.2. Consumo de pescado

1.2.1. Atividade da pesca

A pesca é considerada, desde sempre, uma atividade bastante valorizada, devido desde logo à sua importância económica, uma vez que o pescado (todos os seres vivos aquáticos, incluindo as suas partes ou produtos, que possam ser utilizados para a alimentação humana) ⁽¹⁶⁾ constitui não só uma das principais fontes de abastecimento alimentar da população mundial, incluindo a portuguesa, mas também porque se revela como uma importante fonte de rendimento económica.

Em Portugal, as populações ribeirinhas e litorais têm ao seu dispor uma vasta Zona Económica Exclusiva (ZEE) com aproximadamente 1 700 000 km², uma extensa linha de costa continental (2830 km) e a natureza dos arquipélagos da Madeira e dos Açores ⁽¹⁷⁾.

Verifica-se que Portugal tem o maior consumo *per capita* de pescado (55,6 kg/ano), comparativamente com os restantes países da União Europeia (Fig. 1.1.). ⁽¹⁸⁾ Por outro lado, a nível mundial, Portugal encontra-se entre os vinte principais países que consomem mais pescado *per capita* ⁽¹⁹⁾.



Figura 1.1. Consumo de pescado *per capita* na União Europeia ⁽¹⁸⁾

1.2.2. Aquacultura

Perante o aumento significativo do consumo de pescado, a consequente sobre-exploração de grande parte dos recursos piscícolas e face ao crescimento demográfico da população global nas últimas décadas, a aquacultura é cada vez mais importante na produção mundial de alimentos de origem aquática, para além de contribuir para melhorar a dieta de muitas pessoas, principalmente em áreas rurais mais pobres, onde os alimentos carecem, muitas vezes, de alguns nutrientes essenciais.

De acordo com a Direção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (DGRM), o termo aquacultura é definido como a criação ou cultura de organismos aquáticos (onde se incluem moluscos, peixes, equinodermes, crustáceos e algas), através de técnicas arquitetadas para criar ou amplificar a produção de *stocks*, para além da capacidade natural do meio ⁽²⁰⁾. Esta prática tem vindo a afirmar-se globalmente como uma alternativa aos modos tradicionais de abastecimento de pescado. É de salientar que a produção proveniente de aquacultura, nos dias de hoje, representa metade de todo o pescado consumido a nível mundial, sendo por isso considerada, atualmente, um setor estratégico.

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) ⁽¹⁸⁾, a prática desta atividade tem aumentado ao longo das últimas décadas, tendo contribuído com mais de 74 milhões de toneladas de pescado em 2014, sendo a China o responsável por mais de 60% de toda a produção. A pesca alcançou cerca de 93 milhões de toneladas de pescado, de um total de 167 milhões de toneladas de pescado capturado ou produzido mundialmente (Fig. 1.2.), na medida em que 146 milhões de toneladas de pescado em 2014 foram destinados para consumo humano, tendo-se atingido um novo máximo no valor *per capita* de 20,1 kg/ano mundiais.⁽¹⁸⁾.

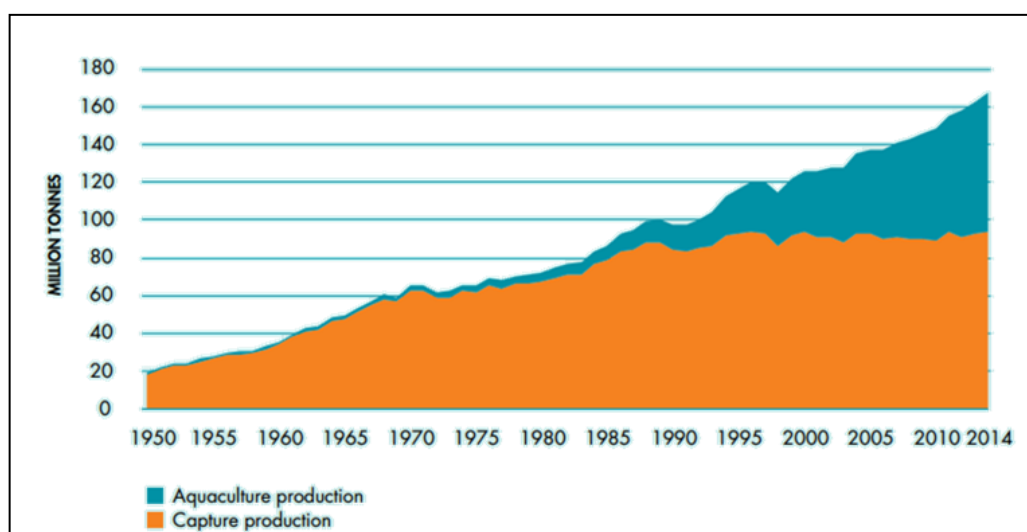


Figura 1.2. Produção mundial de pescado por captura e por produção aquícola ⁽¹⁸⁾

A nível nacional, de acordo com a DGRM (2017) ⁽²⁰⁾, a produção da aquacultura, em 2015, atingiu cerca de 9561 toneladas de pescado, correspondentes a uma receita de 54,1 milhões de euros. A produção em águas salobras (as mais utilizadas na produção de moluscos bivalves, uma vez que é feita em estuários) e marinhas revelou-se a mais importante, pois correspondeu a 91% da produção aquícola total. Neste mesmo ano, é possível constatar que os moluscos bivalves representaram cerca de 53,6 % da produção total, sendo as amêijoas, os mexilhões e as ostras as espécies mais relevantes ⁽²⁰⁾.

Assim, como já foi supracitado, o setor da aquacultura tem vindo a assegurar cerca de 50 % da produção mundial de pescado destinado à alimentação humana, facto que traduz o papel determinante que esta prática poderá ter num futuro próximo na produção mundial de pescado e, consequentemente, na dieta e na saúde da população em geral.

1.2.3. Composição e valor nutricional do pescado

O pescado representa há bastante tempo um importante papel na alimentação, todavia, o seu consumo tem vindo a ganhar cada vez mais adeptos devido à crescente preocupação com a própria saúde e bem-estar e pela plena consciência dos benefícios associados a este tipo de produto alimentar.

Nos dias de hoje, o pescado é distinguido por possuir, para além do elevado valor nutricional dos seus macroconstituintes, uma grande quantidade de micronutrientes, minerais e ácidos gordos essenciais. O consumo de pescado contribui bastante positivamente para a saúde do homem, nomeadamente devido à sua alta digestibilidade e ao facto de serem uma fonte de proteínas importante (ricas em lisina) e de lípidos de elevado valor biológico, tais como os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) do tipo ómega-3 (como o ácido eicosapentaenóico, EPA, e o ácido docosahexaenóico, DHA) capazes de ajudar a prevenir e a tratar doenças cardiovasculares, devido às suas propriedades hipolipidémicas, antiateroscleróticas, antitrombóticas e anti-inflamatórias. ^(18,21).

Em geral, o pescado é composto maioritariamente por água, é rico em vitaminas, sobretudo as lipossolúveis A e D (e também, em menor escala, E e K) e apresenta uma grande variedade de sais minerais, como por exemplo o cálcio, o iodo e o zinco. Revela ainda a presença de constituintes nutricionalmente importantes como a taurina e a colina. ^(22,23).

Tabela 1.1. Composição nutricional de pescado ⁽¹⁶⁾

Composição nutricional de pescado	
Água	60 – 85 %
Lípidos	0,1 – 25 %
Proteínas	15 – 23 %
Hidratos de carbono	0,01 – 0,7 %
Vitaminas	A, D (essencialmente) e também E e K
Sais minerais	0,9 – 2 % (Na, K, Ca, Fe, P, Se, Zn e I)

1.2.4. Segurança e qualidade do pescado

À semelhança dos restantes produtos alimentares, o consumo de organismos aquáticos tem uma estreita relação com a saúde pública, na medida em que a segurança e a qualidade do pescado estão não só relacionadas com a qualidade intrínseca das espécies, mas também com as águas onde elas habitam e, posteriormente, com o modo como o pescado é manuseado após a captura.

O pescado é um produto alimentar extremamente perecível comparativamente com outros de origem animal, devido principalmente à presença de elevada quantidade de água, baixo teor de tecido conjuntivo, tipo de proteínas e, ainda, natureza psicrófila da sua flora bacteriana. Assim, todos os fatores mencionados contribuem para a proliferação de microrganismos e, conseqüentemente para a rápida ocorrência de alterações no produto, resultando na sua desvalorização e rejeição. ⁽²⁴⁾.

A produção em aquacultura tem demonstrado uma evolução bastante positiva respeitante aos cuidados necessários a ter com um produto perecível que, posteriormente, entrará nos circuitos de comercialização até ao consumidor final. Esta prática deve seguir regras de boas práticas de higiene e de manuseio, respeitando os princípios de uma produção responsável e preventiva, de modo a garantir o bem-estar dos animais e para que estes correspondam, no futuro, às exigências nutricionais e toxicológicas.

É da responsabilidade de cada país realizar atividades que promovam a monitorização e sejam capazes de assegurar o cumprimento de referenciais normativos e de regulamentos. Atualmente, a rastreabilidade dos produtos, neste caso do pescado, permite seguir o produto desde a produção até ao consumo, ajudando, assim, a prevenir e a contrariar práticas desadequadas ⁽²⁵⁾.

1.2.5. Qualidade da água

O aumento da população humana e a consequente necessidade de água tem vindo cada vez mais a aumentar, nomeadamente através das suas atividades urbanas, agroindustriais e de lazer que, de forma direta ou indireta, constituem um obstáculo para a manutenção da qualidade da água, tornando-a imprópria para determinados fins ⁽²⁶⁾.

Segundo Mendes (2010), o conceito “qualidade da água” é relativo, uma vez que depende do fim a que se destina. Assim, considera-se impreterível a necessidade de criar parâmetros de qualidade e estabelecer valores-limite ⁽²⁷⁾. Desta forma, o Decreto-Lei nº 236/98, de 1 Agosto considera quatro tipos principais de utilização da água. Neste contexto, apenas serão abordadas as águas para suporte de vida aquícola (definidas como sendo águas superficiais doces ou salobras, continentais ou litorais, destinadas à produção de peixes ou de bivalves) e as águas balneares, como a água do mar.

A legislação regula a gestão das águas superficiais, incluindo as supracitadas, estabelecendo, para tal, limites paramétricos cujo objetivo é prevenir a ocorrência de surtos sanitários.

Estudos comparativos entre espécies provenientes do mar (meio selvagem) e de águas para suporte de vida aquícola (de aquacultura) não têm revelado grandes diferenças a nível geral, nutricional, de textura e, ainda, no que diz respeito à segurança alimentar do consumidor ⁽²⁸⁾.

1.2.6. Perigos associados

Embora o consumo de pescado seja considerado muito benéfico, poderá constituir um risco para a saúde dos consumidores, devido à presença de diversos perigos sanitários.

Conforme a Comissão do *Codex Alimentarius*, o termo “perigo” consiste num “agente biológico, químico ou físico presente no alimento ou situação por ele causada que tenha um efeito adverso na saúde” ⁽⁴⁾.

Segundo Félix (2012), os perigos poderão surgir sempre que se observa falta de higiene ou práticas de manuseamento indevidas. No caso de produtos derivados da pesca ou de aquacultura, estes podem ocorrer no local de origem (na água onde é capturado) ou nas etapas seguintes, como por exemplo no momento da captura e durante o acondicionamento, o transporte e/ou o maneo ⁽²⁹⁾.

Assim, à semelhança de outros géneros alimentícios, o pescado está sujeito a diferentes tipos de perigos, os quais podem ser agrupados em três classes: químicos, físicos e biológicos ⁽³⁰⁾.

a) Perigos químicos

Este tipo de perigos ocorre, principalmente, devido à ação antropogénica, onde se destacam atividades como as descargas de efluentes, inadequação do processamento de lixos e produtos químicos tóxicos para fins agrícolas. ⁽³²⁾.

Os poluentes orgânicos persistentes, os metais pesados (chumbo, mercúrio e cádmio), alergénios, combustível das embarcações, detergentes e desinfetantes usados nos equipamentos da pesca, tintas utilizadas para revestir as embarcações e medicamentos de uso veterinário são alguns dos perigos químicos que podem ser encontrados na parte edível do pescado, expondo, assim, o consumidor a este tipo de substâncias nocivas. ⁽³⁰⁾.

- **Poluentes orgânicos persistentes**

Os poluentes orgânicos persistentes (POP) são compostos orgânicos resistentes à degradação, voláteis, lipofílicos, extremamente tóxicos e ubiqüitários no meio ambiente, sendo que os bifenilos policlorados (PCB) e os pesticidas organoclorados (OCP) pertencem a este grupo de POP ⁽³²⁾. Devido a serem lipofílicos e dada a sua capacidade de bioampliação, estes acumulam-se na gordura animal e a sua concentração pode aumentar com o aumento do nível trófico da cadeia alimentar. Estes compostos podem surgir através da atividade agrícola, incêndios e incineração de resíduos ⁽³³⁾.

No entanto, a Convenção de Estocolmo, tratado internacional assinado em 2001, foi elaborado de maneira a eliminar globalmente a produção e o uso de POP ⁽³²⁾.

- **Metais pesados**

Os metais pesados, principalmente o cádmio, o chumbo e o mercúrio, são os que apresentam maior risco de exposição para os consumidores do pescado, na medida em que o próprio organismo não tem capacidade para os eliminar ⁽³¹⁾. Desta forma, verifica-se o fenómeno de bioacumulação (processo de absorção de substâncias e acumulação no organismo ao longo da vida) ^(34,35).

Contudo, o mercúrio é convertido em metilmercúrio, sendo esta a forma em que é acumulado no pescado; este composto, para além de bioacumulação, pode também sofrer bioampliação ⁽³⁵⁾.

O metilmercúrio apresenta uma elevada toxicidade, podendo provocar lesões no sistema nervoso central, principalmente nos grupos de risco (crianças, grávidas, idosos e imunosuprimidos) ^(33,36).

Todavia, o Regulamento (CE) n.º 1831 /2003 de 22 de setembro de 2003, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, estabelece os valores máximos para alguns metais pesados (cádmio, chumbo e mercúrio) ⁽³⁷⁾.

- **Medicamentos de uso veterinário**

Segundo Baptista *et al.* (2003) o uso excessivo de medicamentos veterinários para fins terapêuticos ou profiláticos em aquacultura podem causar diversos problemas, desde alergias, doenças cancerígenas e mutações genéticas, para além de que a utilização de antibióticos poderá favorecer o desenvolvimento de bactérias multirresistentes ⁽³⁴⁾.

Porém, o Regulamento (CE) nº 37/2010 de 22 de dezembro de 2009 define a classificação relativa aos limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente ativas nos géneros alimentícios de origem animal ⁽³⁸⁾.

- b) Perigos físicos**

Os perigos físicos são constituídos por corpos estranhos de origem diversa, quer seja devido ao percurso do produto desde a origem, quer pela sua deficiente manipulação ⁽³⁴⁾. No caso do pescado são considerados perigos físicos os materiais da pesca, como os fios e os anzóis, e também pedras, conchas, espinhas, madeiras e plásticos, entre outros. Estes podem causar diversos problemas no consumidor, tais como lacerações bocais, esofágicas ou intestinais, asfixia e traumatismo dentário.

Sendo assim, estes perigos podem ser prevenidos através de uma adequada higienização dos equipamentos e de uma atenta inspeção visual, que pode ser auxiliada por detetores de metais ou de raios-X ⁽³⁹⁾.

- c) Perigos biológicos**

Os perigos biológicos são aqueles que constituem um maior risco à inocuidade dos alimentos, representando, deste modo, uma grande ameaça para o consumidor ⁽³⁴⁾. As bactérias, fungos, vírus, parasitas e toxinas constituem perigos biológicos, na medida em que o seu aparecimento é frequentemente associado a más práticas de manuseio e à contaminação do ambiente, neste caso do meio aquático ⁽³⁵⁾.

- **Fungos**

Os bolores e as leveduras estão incluídos no grupo dos fungos, apesar de alguns serem benéficos e utilizados na produção de certos alimentos, como o queijo; no entanto, outros tipos de fungos podem produzir micotoxinas (substâncias tóxicas) prejudiciais ao humano ⁽³⁴⁾.

- **Parasitas**

Os parasitas são seres, na sua maioria, de dimensões muito reduzidas, capazes de sobreviverem em todo o tipo de ambientes e são específicos para cada hospedeiro animal, incluindo o homem, podendo

crescer e atingir o estado adulto no trato gastrointestinal ou serem diretamente ingeridos devido ao consumo de animais contaminados ⁽⁴⁰⁾.

As infestações por parasitas estão maioritariamente associadas a produtos insuficientemente cozinhados ou produtos servidos *in natura*, tal como o pescado cru. Entre eles encontram-se, mais frequentemente, os nemátodes como o *Anisakis simplex*, o qual constitui um risco elevado para a saúde pública ⁽⁴¹⁾. Entre os principais parasitas protozoários causadores de doenças alimentares pela ingestão de bivalves surgem: *Giardia lamblia*, *G. intestinalis* e *Cryptosporidium parvum*. Fayer *et al.* (1997) referem que oocistos deste último parasita ingeridos por ostras-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*) ficavam retidos no seu tubo digestivo e nos hematócitos, continuando, assim, a manter a virulência ^(40,42).

Assim, o Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de abril de 2004 menciona que os produtos derivados da pesca devem ser submetidos a uma inspeção visual para a deteção de parasitas visíveis, na medida em que não é permitida a venda de produtos que possuam estes seres ⁽⁴³⁾. Contudo, o Regulamento (CE) n.º 1276/2011 de 8 de Dezembro de 2011 que altera o anexo III do Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de abril de 2004 relativamente ao tratamento para eliminar parasitas define que os operadores do setor alimentar devem garantir a congelação dos produtos da pesca prontos a serem consumidos *in natura*, produtos marinados, salgados ou outros produtos sujeitos a tipos de processamento que não são suficientes para eliminar os parasitas ⁽⁴⁴⁾.

- **Biotoxinas marinhas**

As biotoxinas marinhas são produzidas, normalmente, por microalgas (fitoplâncton) tóxicas que podem desencadear doenças no Homem quando presentes numa quantidade significativa no molusco bivalve, uma vez que constituem a base da cadeia alimentar marinha ⁽³⁹⁾. Podem provocar intoxicações alimentares agudas com sintomas gastrointestinais e problemas respiratórios (entre outros) e, em alguns casos, podem ser fatais. Em Portugal, há microalgas que assumem um papel relevante em certas intoxicações que podem ser fatais, sendo por isso regularmente monitorizadas ^(39,45):

- *Diarrhetic shellfish poisoning* (DSP): Causa sintomas gastrointestinais algumas horas após a ingestão;
- *Paralytic shellfish poisoning* (PSP): Causa sintomas de paralisia apresentados entre meia hora a duas horas depois do consumo;
- *Amnesic shellfish poisoning* (ASP): Provoca a perda permanente de memória recente e manifesta-se nas primeiras 24 horas após o consumo.

Estas toxinas são termoestáveis, pelo que não são destruídas pelo tratamento térmico que ocorre durante a confeção, nem por processos como a esterilização ou a depuração de bivalves, para além de

que não alteram o pescado, quer a nível do odor, cor e aspeto em geral. De acordo com o Regulamento (CE) nº 854/2004 de 29 de abril de 2004, de modo a prevenir a ocorrência de problemas nos consumidores, torna-se necessário monitorizar e, se necessário, interditar a captura de bivalves até que as populações de microalgas tóxicas se reduzam a níveis normais e a toxina seja eliminada dos tecidos do animal ⁽⁴⁶⁾.

- **Vírus entéricos**

Os vírus entéricos são parasitas intracelulares estritos, não tendo, portanto, capacidade de replicação nos alimentos ou na água, ou seja, precisam de uma célula viva de animais para servir como hospedeiro e, assim, multiplicarem-se ⁽⁴⁰⁾.

Sendo assim, os produtos da pesca podem ser infetados por estes agentes infecciosos acelulares através de veículos hídricos (rios, estuários, oceanos) contaminados por atividades antropogénicas ou ao longo do circuito de captura até ao consumidor, principalmente devido a inadequadas práticas de higiene e maneo pelos manipuladores (Fig. 1.3.) ⁽⁴⁰⁾.

Os vírus entéricos são excretados nas fezes de animais ou de humanos, nomeadamente na ordem de 10^8 a 10^{11} partículas/g de fezes, e são transmitidos, essencialmente, via fecal-oral ⁽⁴⁷⁾.

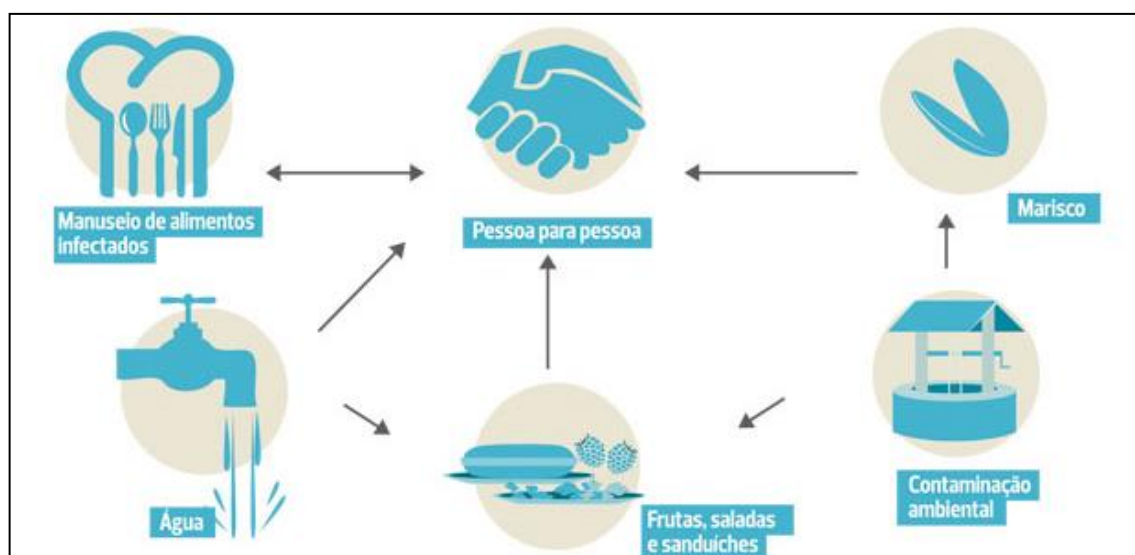


Figura 1.3. Modo de transmissão de vírus entéricos ⁽⁴⁸⁾

A estabilidade deste tipo de vírus varia consoante a quantidade inicial presente, o método de processamento usado, a dose necessária para causar a infeção e a suscetibilidade dos indivíduos, revelando-se, no entanto, extremamente estáveis no meio aquático. Estes vírus apresentam-se resistentes a determinados agentes de inativação, como a humidade, pH, temperatura, cloro e radiações ultravioleta (UV) ⁽⁴⁹⁾.

Desta forma, verifica-se assim, que os produtos da pesca servidos *in natura* revelam-se bastante suscetíveis, podendo, certamente, conter vírus entéricos e transmitindo-os ao consumidor final, principalmente o tipo norovírus e o vírus da hepatite A, pois são aqueles que têm sido mais associados à ocorrência de surtos no humano. Estes são caracterizados por náuseas, vômitos, diarreia aquosa, dor abdominal, febre e dores musculares, sendo que o vírus da hepatite A pode, ainda, causar doença hepática ^(15,50).

O controlo, a prevenção e a consequente minimização dos agentes virais de origem alimentar, implicam diminuir as descargas dos esgotos nas águas, aplicar boas práticas de higiene e de manuseio e confeccionar os produtos da pesca a temperaturas suficientemente elevadas ⁽³⁰⁾.

Contudo, apesar da problemática dos vírus de origem alimentar ser emergente para a saúde pública, a sua presença nem sempre é tida em conta nos critérios de avaliação de qualidade e segurança, como por exemplo nas águas de produção de bivalves ^(51,52).

- **Bactérias**

As bactérias presentes no meio aquático têm morfologia, fisiologia e taxas de desenvolvimento ou sobrevivência específicas, uma vez que são condicionadas por certos fatores, entre eles a exposição à luz solar, a temperatura, a salinidade, o pH, matéria em suspensão, presença de nutrientes, predadores e competidores. Determinadas bactérias conseguem adaptar-se aos diferentes meios, permanecendo viáveis durante muito tempo, contudo, não são cultiváveis ⁽⁴⁰⁾.

Devido ao crescente consumo de pescado cru, a segurança do consumidor tem vindo a ser uma preocupação constante, principalmente pela inexistência de um processamento térmico, durante a confeção, capaz de eliminar ou reduzir este tipo de perigo biológico ⁽³⁴⁾.

Segundos dados epidemiológicos, os agentes etiológicos que afetam mais o pescado são os microrganismos pertencentes ao género *Vibrio* spp. (mais particularmente o *V. parahaemolyticus*), *Clostridium* spp., *Listeria* spp. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas* spp., sendo estas bactérias consideradas endógenas, uma vez que se encontram no meio ambiente e no próprio pescado ⁽⁴⁰⁾. Por outro lado, existem as bactérias exógenas (*Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Shigella* spp. *E. coli*) propícias a

contaminar o produto da pesca devido a más práticas de higiene e maneo ou devido à contaminação da água por ação antropogénica ⁽⁵³⁾.

Sendo assim, para a análise destes e de outros microrganismos são consideradas e utilizadas normas de qualidade, produzidas por um órgão oficial acreditado, cuja função é estabelecer regras e diretrizes, uniformizando, assim, a análise de um material, produto, processo ou serviço.

De seguida serão descritos os microrganismos mais relevantes no que dizem respeito ao consumo de pescado cru e ao meio aquático.

i) *Vibrio* spp.

Bactérias Gram-negativas e anaeróbias facultativas presentes em zonas costeiras e em estuários. As espécies *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* são as principais causas de vários surtos de toxinfecções alimentares, estas bactérias patogénicas são capazes de se adaptarem à temperatura da água, desde que varie entre 10 a 30 °C, uma vez que são mesófilas ^(53,54).

Butt *et al.* (2004) referem que existem outros fatores associados à presença de *Vibrio* spp., nomeadamente a salinidade da água e a matéria orgânica disponível ⁽⁵⁴⁾.

Huss (1997) refere que este género tem uma rápida proliferação em pescado cru, incluindo marisco, até quando este se encontra a temperaturas de refrigeração, podendo causar desde gastroenterites ligeiras até à cólera (causada pelo *V. cholerae*), a qual é responsável pela morte de milhares de pessoas, principalmente, nos países em desenvolvimento ⁽⁵⁵⁾. Desta forma, considera-se que é necessário cozinhar os alimentos como modo de prevenção e tratar as águas contaminadas, pois estas são igualmente um veículo de contaminação.

ii) *Clostridium* spp.

O género *Clostridium* possui forma de bacilo, é Gram-positivo e anaeróbio estrito. Produz esporos subterminais, é imóvel, fermentador de lactose e liquefaz a gelatina ⁽⁵³⁾. Para além de reduzir nitrato e sulfito, revelam-se bactérias ubiqüitárias, pois encontram-se no solo, na água (incluindo sedimentos marinhos) e no trato gastrointestinal dos humanos e dos animais endotérmicos ⁽⁴⁰⁾.

A espécie *Clostridium perfringens* é uma bactéria capaz de indicar a poluição das águas de origem fecal quer remota quer intermitente, devido à extrema resistência e permanência dos esporos na água face a condições desfavoráveis, tais como a temperatura e pH extremos e processos de desinfecção, como o uso de cloro e radiações UV. Esta bactéria pode causar doenças como enterite e gangrena gasosa ^(53,56).

Por outro lado, a bactéria patogénica *Clostridium botulinum* provoca o botulismo, toxinfecção alimentar associada a géneros alimentícios, incluindo o pescado, sendo considerada a mais grave neste tipo de produto alimentar e a qual afeta o sistema nervoso central ⁽⁵⁷⁾.

A produção da toxina tipo E da bactéria em questão, para além de não alterar as características sensoriais do pescado, verifica-se que é a mais a comum neste tipo de produto, sendo que este facto constitui ainda uma maior preocupação no pescado consumido cru, visto que é possível proliferar-se a temperaturas de refrigeração, nomeadamente entre 3 a 5 °C. Ao invés, a toxina botulínica revela dificuldade em estabilizar-se a temperaturas altas, pelo que a execução de um processamento térmico inativa a toxina, à semelhança de outras técnicas como a salmoura e a secagem que previnem o crescimento de *Clostridium botulinum* devido à redução da atividade da água, fermentação ou acidificação do produto da pesca ⁽⁵⁸⁾.

iii) *Listeria monocytogenes*

Bactéria em forma de bacilo, Gram-positiva e anaeróbia facultativa. Butt *et al.* (2004) referem que esta cresce a 30 e 37 °C, no entanto, pode desenvolver-se, mais lentamente, a 4 °C. ⁽⁵⁴⁾. Esta é responsável pela listeriose no humano, pelo que a sua deteção é relativamente elevada no pescado. A sua presença deve-se, principalmente, a práticas de higiene deficientes.

A listeriose provoca lesões no sistema nervoso central, podendo manifestar outros sintomas, entre eles a endocardite, septicémia, artrite, infeções pulmonares e aborto espontâneo, sendo as grávidas e os recém-nascidos os grupos mais afetados ⁽⁵⁴⁾.

iv) *Staphylococcus coagulase-positiva*

Bactéria cocos, imóvel, Gram-positiva e anaeróbia facultativa, no entanto tem um maior crescimento em condições de aerobiose. São bactérias mesófilas, crescendo, portanto, entre os 7 e 47,8 °C, sendo que a produção de enterotoxinas ocorre entre os 10 e os 46 °C ⁽⁷⁾.

Os estafilococos estão presentes em diversas regiões do corpo humano, nomeadamente no nariz, na garganta, nas glândulas mamárias, no trato urinário e intestinal. Contudo, também podem ser encontrados em animais consumidos pelo homem. A presença de algumas estirpes nos géneros alimentícios podem causar nos humanos intoxicações alimentares; entre os principais sintomas estão os vómitos, diarreia, náuseas e, nos casos mais graves, a desidratação ⁽⁵⁹⁾.

A deteção desta bactéria, para além de estar presente no meio ambiente, está associada a más práticas de higiene e de maneo, principalmente pelos manipuladores infetados, desde a captura até à confeção do produto ⁽⁵⁴⁾.

Os estafilococos apresentam tolerância ao calor e ao sal, daí que tanto os processamentos térmicos como a salga podem não conseguir extinguir esta bactéria no alimento. Desta forma, o pescado servido cru acarreta um grande risco, uma vez que são manipulados manualmente e não são sujeitos à cozedura ⁽⁵⁶⁾.

v) Microrganismos totais a 22 °C e a 37 °C

Os microrganismos a 22 °C e a 37 °C indicam a contaminação geral da água. Assim, as placas incubadas a 37 °C, correspondentes aos microrganismos mesófilos, referem que a contaminação deriva da ação humana ou de animais endotérmicos. Por outro lado, a incubação a 22°C (microrganismos ambientais) demonstra que a água encontra-se contaminada devido a origem ambiental ⁽⁵⁵⁾.

Deste modo, verifica-se que quanto maior a contagem de totais a ambas temperaturas, maior será a probabilidade de a água possuir contaminação fecal ⁽²⁷⁾.

vi) Enterobacteriaceae

As bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae estão presentes no intestino humano e de animais endotérmicos, podendo ainda estarem naturalmente presentes na água, solo e vegetação ⁽⁵⁵⁾. Apresentam-se como bacilos Gram-negativos não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase negativa, catalase positiva e fermentadores de lactose.

A *E. coli* é usada como o principal indicador de contaminação fecal, pois para além de ser a bactéria mais frequente no humano e nos animais endotérmicos, desempenha um papel importante na flora intestinal. Todavia, possui estirpes patogénicas, transmitidas através dos alimentos para o homem. Estas podem causar infeções no sistema urinário e ainda causarem doenças diarreicas ^(55,60). Estas bactérias são consideradas indicadores de contaminação fecal, pois são excretadas pelas fezes num número bastante elevado. Estão incluídos nesta família os géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*.

Relativamente à *Salmonella* spp., estas surgem principalmente em águas poluídas com matéria fecal, tanto de animais como de humanos, pelo que a infeção pode ser transmitida por géneros alimentícios e por água, podendo, assim, causar salmonelose com síndrome tifóide ou gastroenterite, as quais incluem sintomas, como diarreia, febre e dores abdominais ⁽⁵⁴⁾.

Deste modo, ambas as bactérias supracitadas são capazes de sobreviverem e multiplicarem-se em ambientes não só estuarinos ao longo de semanas, como em águas poluídas por fezes.

vii) *Enterococcus* spp.

Bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, anaeróbias facultativas, apresentam catalase negativa, fermentam lactose e hidrolisam esculina. Apresentam ainda resistência a soluções salinas de NaCl a 6,5% e pH 9,6 sendo, por isso, consideradas as mais apropriadas para determinar a contaminação fecal em ambientes marinhos ^(53,61).

Estes microrganismos encontram-se no trato intestinal e urinário tanto em humanos como em animais. A presença de enterococos fecais demonstra más práticas de higiene e contaminação recente, pelo que a transmissão destas bactérias pode ser causada através de origem endógena, alimentar e pela água. Bactérias deste género, como a espécie *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans* e *E. gallinarum* podem causar doenças como a endocardite, infeções urinárias, meningite e septicémia ^(62,63).

1.3. Caracterização das espécies em estudo

1.3.1. Ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*)

A ostra-do-Pacífico ou ostra-japonesa, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) pertencente ao filo Mollusca e à classe dos bivalves, é constituída por uma concha calcária alongada, normalmente esbranquiçada, composta por duas valvas (Fig. 1.4.), nomeadamente uma valva direita ligeiramente plana e uma valva esquerda côncava. Estas encontram-se unidas por músculos adutores e um ligamento que controlam a sua abertura, a qual se dá durante o repouso ou quando os bivalves estão mortos (Fig. 1.5. e 1.6.) ⁽⁶⁴⁾.



Figura 1.4. Exterior de *C.gigas* (adaptado) ⁽⁶⁵⁾



Figura 1.5. Interior de *C. gigas*

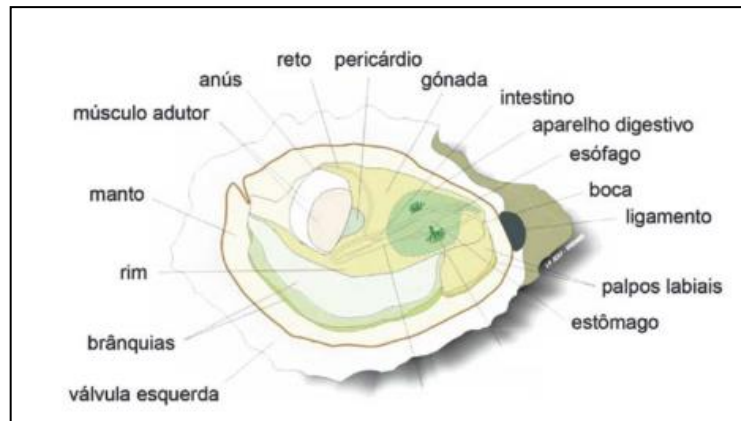


Figura 1.6. Anatomia interna de *C.gigas* (adaptado) ⁽⁶⁶⁾

As ostras alimentam-se pelo processo de filtração, através de cílios das brânquias, os quais retêm partículas suspensas na água. Assim, estes organismos filtradores não seletivos possuem uma dieta bastante variada, sendo principalmente constituída por fitoplâncton, bactérias e protozoários ⁽⁴⁰⁾.

A *Crassostrea gigas* é uma espécie hermafrodita protândrica (inicialmente é macho e depois torna-se fêmea ao longo do ciclo de vida) e possui fecundação externa, sendo que em cada desova a fêmea liberta cerca de 50 a 100 milhões de ovos ^(40,64).

A espécie *Crassostrea gigas* é endêmica do Japão, tendo sido introduzida para cultivo um pouco por todo o mundo. O sucesso de produção deste bivalve deve-se às suas características biológicas, as quais lhe permitem tolerar diversas condições ambientais, como grandes amplitudes de salinidade e temperatura, incluindo o facto de terem um rápido crescimento, sendo o comprimento médio de uma ostra adulta cerca de 80-150 mm ⁽⁴¹⁾.

Estes animais encontram-se tanto em zonas de estuários como em zonas costeiras, preferindo, geralmente, fundos rochosos e lodosos, aos quais se fixam através do bisso (feixe de filamentos que se fixa ao substrato) ⁽⁴⁰⁾.

1.3.1.1. Importância e comercialização

Bioindicador

Como já foi referido anteriormente, os moluscos adaptam-se muito facilmente às condições ambientais em que estão inseridos, incluindo águas poluídas. Deste modo, o habitat das ostras aliado à sua capacidade filtradora fazem com que estes animais sejam um indicador do meio onde se encontram. A ação de bioacumulação destes seres permite-lhes concentrar no seu interior elementos presentes nas águas, incluindo os que são patogénicos para o homem, tais como bactérias, vírus entéricos, protozoários, metais pesados, entre outros ⁽⁶⁷⁾. Sendo que, a concentração destes é diretamente

proporcional à que é observada no sedimento adjacente e, consequentemente, no biofilme superficial, e ao seu desenvolvimento sexual. Desta forma, o facto de as ostras serem consumidas, maioritariamente, cruas, revela um grande perigo para a saúde pública ⁽⁴⁰⁾.

Segundo Orban *et al.* (2006), a qualidade do ambiente de cultivo é capaz de indicar os requisitos de qualidade dos bivalves, garantindo, assim, que este para além de ser saudável é um produto seguro ⁽⁶⁸⁾. Assim, os bivalves têm sido utilizados como bioindicadores de programas de monitorização ambiental, durante os quais são efetuados rastreios tanto químicos como biológicos, de maneira a obter valores indicadores do grau de contaminação do meio ⁽⁴⁰⁾.

Desde há muito tempo que a *C. gigas* é uma espécie de elevado interesse, uma vez que tem grande valor nutricional e um elevado valor comercial.

Parte edível

A parte edível da ostra (carne e líquido intravalvar) corresponde a cerca de 10% do seu peso total. Apresenta-se como uma fonte de vitamina A e B12, proteína e sais minerais, como o zinco, ferro, cobre e magnésio. É de salientar que a sazonalidade pode afetar a composição bioquímica da *C. gigas* através da variação da temperatura e da qualidade do meio aquático ⁽⁴⁰⁾.

Aquacultura

A *C. gigas* é uma das espécies mais produzidas em aquacultura no mundo, embora seja originária do Japão, pelo simples facto de ter um rápido crescimento e de tolerar amplas condições ambientais, como já foi supracitado.

A produção em aquacultura da espécie em questão tem crescido de forma constante ao longo dos anos (Fig. 1.7.) e, provavelmente, continuará a expandir nos próximos anos, embora mais lentamente, devido à crescente urbanização junto à costa e à necessidade de partilhar o espaço com outras espécies, quer sejam ou não seus predadores ⁽⁶⁴⁾.

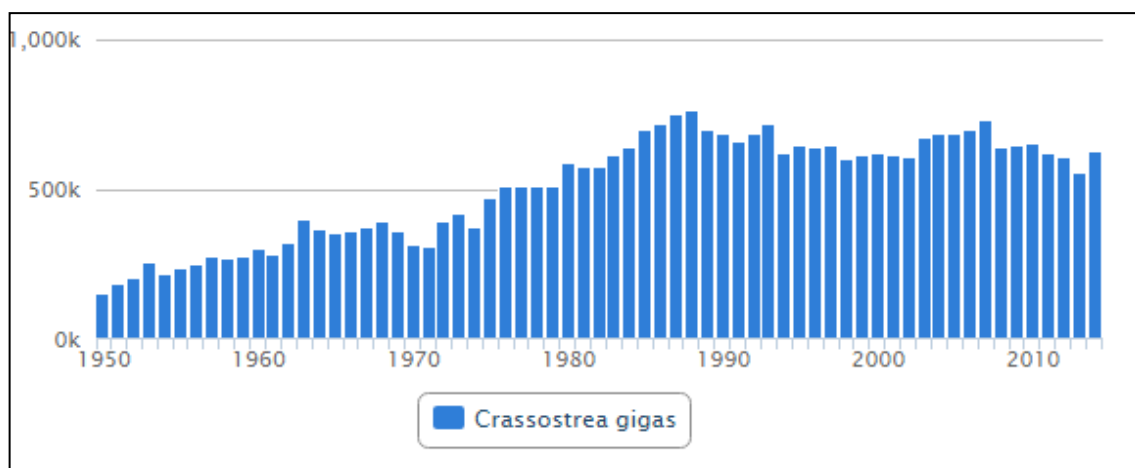


Figura 1.7. Produção aquícola global de *C. gigas* em toneladas (adaptado) ⁽⁶⁴⁾

1.3.1.2. Monitorização ambiental

A monitorização ambiental microbiológica é executada pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), o qual classifica e monitoriza as zonas de produção de moluscos bivalves (ZPB) em Portugal, incluindo o seu controlo sanitário. Este baseia-se, principalmente, na quantificação do teor de bactérias indicadoras de contaminação fecal (*E.coli*). Assim, para cada zona específica de produção é estabelecido um programa anual de amostragem de moluscos bivalves vivos e, tendo como base a análise dos dados adquiridos, é determinado o número de amostras a realizar, a distribuição geográfica dos locais de amostragem e a sua frequência. Pretendendo-se, deste modo, que os resultados sejam representativos de cada zona de produção ⁽⁴⁰⁾.

As ZPB são classificadas em categorias ou estatuto sanitário, tendo em conta os teores bacteriológicos encontrados nessas zonas (Tabela 1.2.). Atualmente, a divisão das ZPB é baseada no Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais por 100 g de carne e líquido intravalvar. Este modo de classificação permitiu avaliar o grau de contaminação fecal nas diferentes zonas, determinando, posteriormente, qual o tipo de tratamento necessário para a comercialização dos bivalves, como por exemplo a técnica de depuração ou então, em último caso, proceder à interdição da captura dos bivalves nestas mesmas zonas quando estes se revelam impróprios para o consumo humano ⁽⁶⁹⁾.

Tabela 1.2. Sistema de classificação das ZPB ⁽⁶⁹⁾

Classes	Níveis permitidos (Teor de <i>E. coli</i> /100 g)	Resultados
A	≤ 230 <i>E. coli</i> /100 g de carne e líquido intravalvar	Centro de Expedição e Consumo direto
B	$230 < E. coli \leq 4600$ /100 g de carne e líquido intravalvar em 90 % das amostras	Depuração e depois cumprir os requisitos da Classe A
C	$4600 < E. coli \leq 46\,000$ /100 g de carne e líquido intravalvar	Indústria transformadora ou permanecer pelo menos 2 meses em zona de transposição
Proibida a apanha	$>46\,000$ <i>E. coli</i> /100g de carne e líquido intravalvar	

1.3.1.3. Depuração

Durante a ingestão de alimentos, como já foi anteriormente referido, os bivalves vão acumulando diversos microrganismos e outras partículas suspensas na água. Deste modo, para assegurar a sua comercialização e posterior consumo humano foram estabelecidas regras específicas de higiene aplicáveis aos alimentos de origem animal (Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de Abril de 2004) ⁽⁴³⁾.

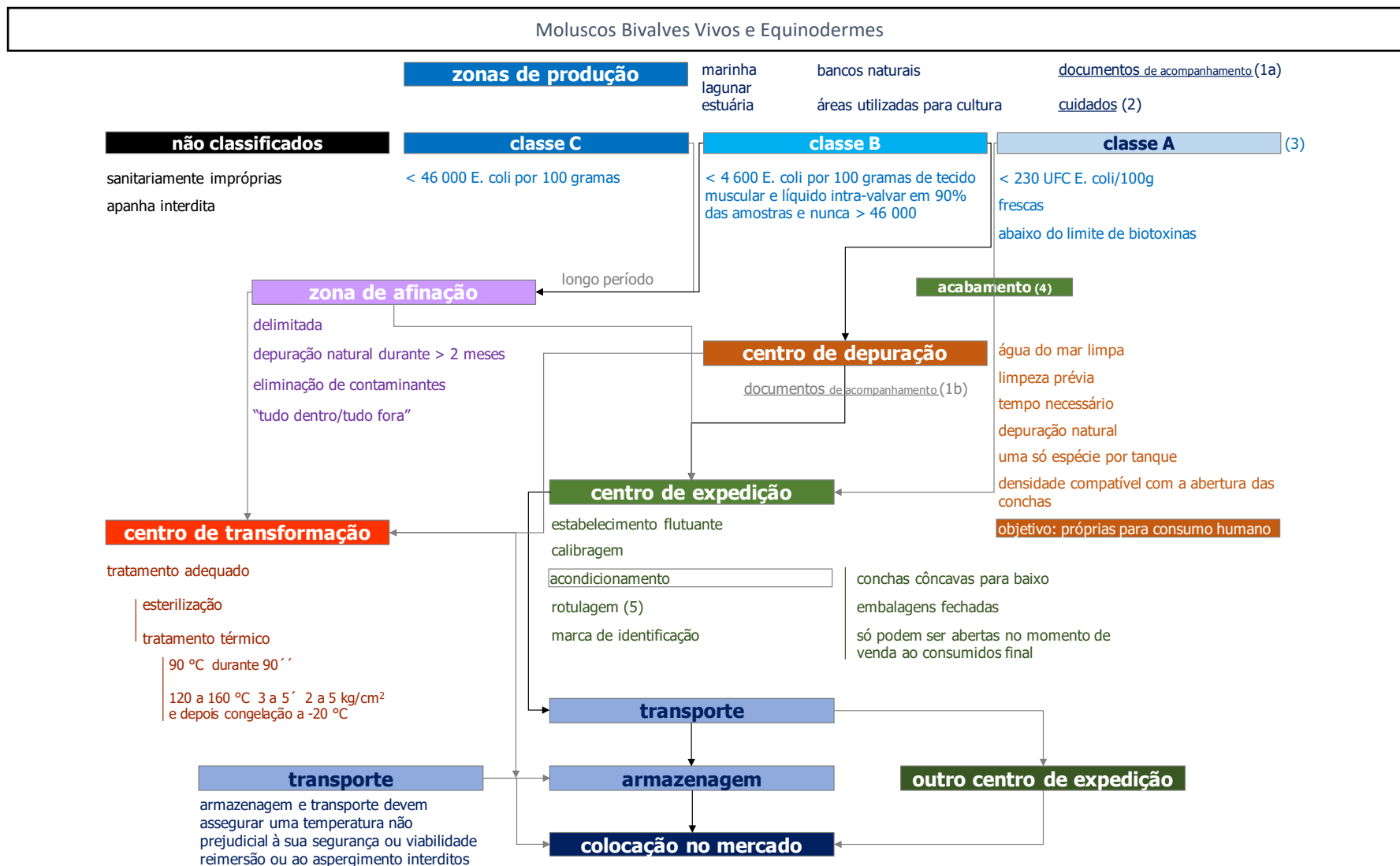
O processo de depuração é baseado na capacidade de filtração dos moluscos bivalves para a sua alimentação e respiração. Estes são colocados em tanques com água do mar (captada ou não diretamente) esterilizada, filtrada e com a temperatura, oxigenação e salinidade controladas durante pelo menos 42 horas ⁽⁴⁰⁾. Todas estas condições irão permitir a retoma da filtração normal do animal que, consequentemente irá expulsar os microrganismos acumulados no seu organismo, de maneira a ficar apto para o consumo humano.

Nos sistemas de depuração de moluscos bivalves usados pela indústria é preciso assegurar a esterilização da água, sendo esta efetuada com recurso a radiações UV, ozono ou cloro ⁽⁴⁰⁾.

- **Radiações UV:** Destroem as moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) dos microrganismos, inativando-os.
- **Ozono e Cloro:** Atuam como agentes oxidantes, promovendo a inativação da matéria orgânica presente na água. Após a depuração de bivalves é possível verificar que no fim de todo o processo são atingidos níveis não detetáveis de bactérias. Todavia, nem todos os

microrganismos são eliminados, tais como os vírus e as biotoxinas provenientes de microalgas tóxicas. Os estudos efetuados sobre a depuração de moluscos bivalves têm maior incidência sobre contaminantes microbiológicos. Embora em menor quantidade, existem também alguns estudos que demonstram a redução da toxicidade dos metais no organismo dos bivalves.

Sendo assim, os lotes de moluscos bivalves vivos das zonas de produção pertencentes à zona B (Tabela 1.2.), tal como a ostra do presente estudo, têm de ser obrigatoriamente depurados.



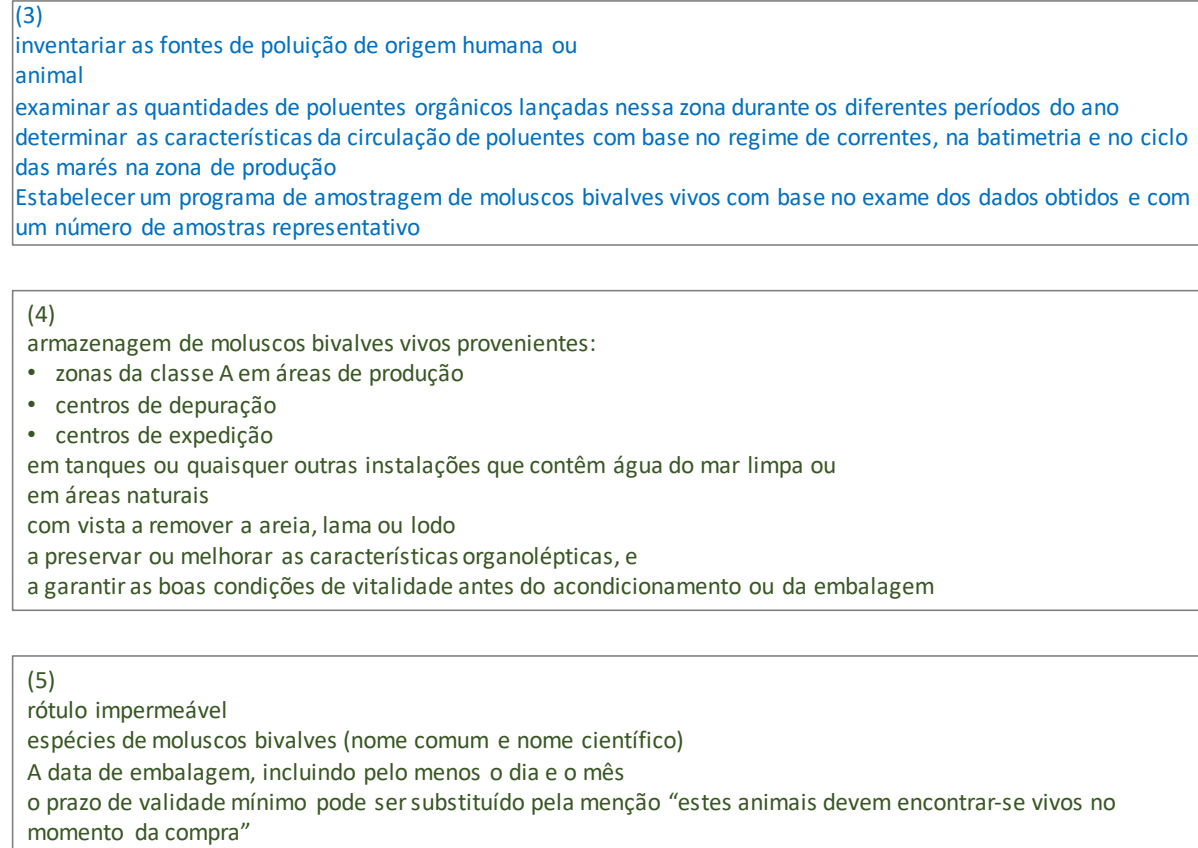
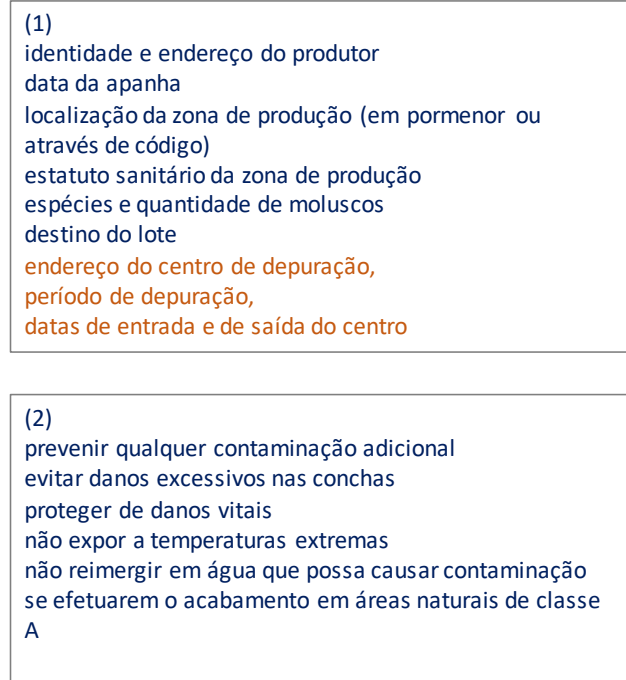


Figura 1.8. Resumo das etapas, procedimentos e requisitos necessários para a colocação de ostras e equinodermes no mercado (para consumo humano). Esquema elaborado conforme os preceitos inscritos no Regulamento (CE) nº 852/2004, Regulamento (CE) nº 853/2004, Regulamento (CE) nº 854/2004 e Regulamento (CE) nº 2073 /2005.

1.3.2. Ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*)

O ouriço-do-mar é um invertebrado marinho herbívoro, dióico, realiza fecundação externa e pertence à classe Echinoidea do filo Echinodermata, dentro do qual estão também as estrelas-do-mar, os lírios do mar, as holotúrias ou pepinos-do-mar.⁽⁷⁰⁾

Os ouriços-do-mar apresentam variadas cores, como o verde, roxo, branco e castanho (Fig. 1.9.e 1.10.), porém, estas não estão relacionadas com a profundidade em que habitam, sexo, tipo de alimentação, nem com o respetivo tamanho⁽⁷¹⁾.

O animal em causa apresenta um esqueleto duro formado por placas calcárias (teca), onde estão dispostos os espinhos duros e móveis (Fig. 1.9.), enquanto na porção inferior, no centro, encontra-se o aparelho bucal constituído por cinco lâminas, equivalentes a dentes e denominado de lanterna de Aristóteles (Fig. 1.10.)⁽⁷⁰⁾.



Figura 1.9. Parte superior de *P. lividus* ⁽⁷²⁾.



Figura 1.10. Parte inferior de *P. lividus*.

O equinoderme em causa possui um fluido, o líquido celómico, que envolve os órgãos internos e efetua o transporte de gases e a sua excreção, sendo composto por células que fagocitam substâncias estranhas, facto este que é de extrema relevância, pois os equinodermes são organismos bentónicos (vivem associados ao substrato quer estejam ou não fixos) que estão constantemente expostos a elevadas concentrações de bactérias, vírus e fungos ^(73–76). Estes podem causar danos para o animal, pelo que a sobrevivência destes organismos depende de mecanismos antimicrobianos eficientes que os protejam contra infeções microbianas ⁽⁷⁶⁾.

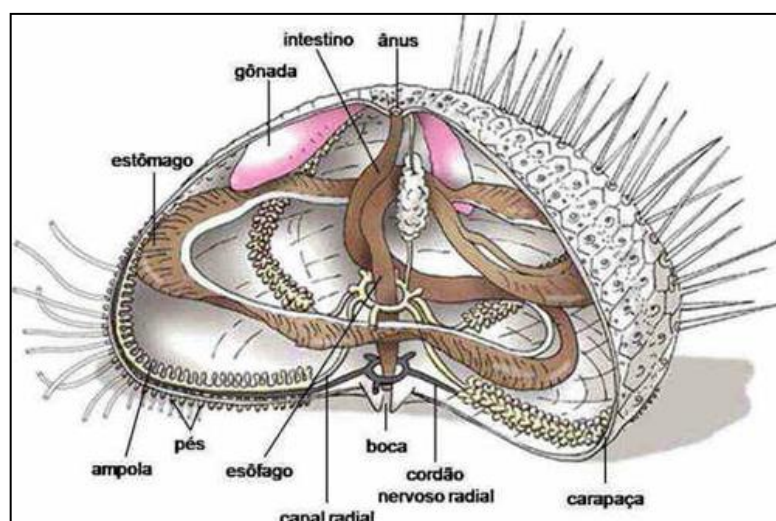


Figura 1.11. Anatomia interna de ouriço-do-mar ⁽⁷⁷⁾

É um animal com elevada capacidade de resistência e adaptação à variedade dos diversos fatores que caracterizam o meio costeiro, tais como a temperatura, hidrodinamismo, disponibilidade de alimento, etc. Os seus predadores mais comuns são os crustáceos decápodes ou estrelas-do-mar, e variadas espécies de peixes ⁽⁷⁸⁾.

A espécie em estudo de ouriços-do-mar, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), é uma das espécies de equinodermes que surgem maioritariamente em cavidades ao longo de todo o intertidal rochoso (zona entre maré cheia e maré baixa), nomeadamente entre 10 a 20 metros de profundidade, embora seja mais abundante nos primeiros metros, devido a uma maior disponibilidade de alimento ^(70,79).

Paracentrotus lividus está distribuído ao longo do Mar Mediterrâneo, do oceano Atlântico nordeste, desde a Escócia, Irlanda, sul de Marrocos, ilhas Canárias e arquipélago dos Açores ^(70,78). Esta espécie revela-se como a mais dominante na costa portuguesa, de maneira que poderá ser encontrada especialmente em áreas onde a temperatura da água do mar ronda entre os 10 e os 15 °C durante o inverno e entre 18 a 25 °C ao longo do verão ⁽⁷⁰⁾.

1.3.2.1.Importância e comercialização

Bioindicador

O aumento da poluição marinha no mundo tem exigido estratégias de controlo e vigilância dos contaminantes que são mais comuns no ambiente marinho. Os organismos indicadores de poluição podem bioacumular poluentes nos seus tecidos em níveis elevados, sendo proporcionais àqueles que existem no meio marinho ⁽⁴⁹⁾. Equinodermes, especialmente as espécies *Paracentrotus lividus* e *Arbacia*

lixula, têm sido propostos como indicadores de poluição marinha tendo a vantagem de viver tanto em áreas poluídas como não poluídas ^(80,81).

A diversidade metabólica e a capacidade de se adaptarem ao *stress* de foro ambiental são características imprescindíveis dos microrganismos. As bactérias encontram-se na água em dois estados básicos de vida: células planctónicas que são conhecidas como células de vida livre ou como células sésseis, também conhecidas como biofilmes ⁽⁸²⁾. Alguns estudos têm divulgado que a maioria das bactérias não crescem como células individuais, mas sim em comunidades estruturadas como organismos pseudomulticelulares ou em biofilmes, sendo que a sua presença pode ser percebida em todos os ecossistemas naturais e patogénicos ⁽⁸²⁾.

A consequente formação do biofilme na superfície do ouriço-do-mar, através da adesão bacteriana, possui um papel importante na patogénese, caracterizando um grande obstáculo para a saúde humana, sendo a causa de infeções persistentes ⁽⁸³⁾.

Parte Edível

Atualmente, o ouriço-do-mar, *Paracentrotus lividus*, é consumido essencialmente em França, Espanha e Japão e, embora em menor quantidade, em Itália e na Grécia ⁽⁸⁴⁾.

O interesse alimentar em torno dos ouriços-do-mar centra-se nas suas gónadas, consumidas quer processadas quer cruas, sendo o último método o preferencial pelos consumidores. Estas, comparadas ao caviar, para além de possuírem uma excelente composição nutricional e um sabor único, são intensamente apreciadas e valorizadas pela cozinha internacional, caracterizando-as como um produto *gourmet* ^(70,85,86).

A análise sensorial, principalmente visual, das gónadas é deveras importante, pois através da sua cor é possível averiguar a qualidade do produto. Desta forma, considera-se que as gónadas são de boa qualidade caso se apresentem com uma cor amarela brilhante ou laranja, possuam uma textura firme e sejam manipuladas com cuidados acrescidos para evitar o *stress*, evitando a libertação dos gâmetas.

Aquacultura

Tal como os restantes recursos pesqueiros, a população de ouriços-do-mar tem vindo a ser sobre-explorada, daí a necessidade de criar esforços de modo a desenvolver a produção aquícola deste produto, a satisfazer a procura no mercado e, simultaneamente, evitar a rutura dos *stocks* naturais ainda disponíveis. Contudo, este setor ainda está longe de conseguir cobrir a elevada procura

mundial⁽⁷¹⁾. Tendo como alguns impasses a ausência de um modelo comprovativo funcional à escala comercial de sistemas de produção, falta de incentivo, reduzida procura no mercado interno, inexistência de infraestruturas e insegurança financeira devido ao elevado investimento inicial.

Apanha

O consumo de ouriços-do-mar em Portugal é diminuto, contudo, a apanha deste espécime ocorre ao longo de toda a linha rochosa em todo o país, sendo executada com maior intensidade no Alentejo, onde esta é uma das principais espécies apanhadas, mesmo sendo de forma lúdica e sazonal ⁽⁸⁷⁾.

Segundo a Portaria nº 1228/2010 a atividade em questão pode ser efetuada tanto para fins lúdicos, comerciais ou científicos ⁽⁸⁸⁾.

A única atividade comercial em grande escala ocorre no norte do país devido à existência de uma empresa que compra as capturas para posterior exportação e venda a Espanha como por exemplo, onde a apanha excessiva causou drásticas reduções no *stock* ⁽⁷²⁾. Esta apanha é realizada entre o final do inverno e o início da primavera, pois é nesta altura que as gónadas (parte edível) atingem o seu maior desenvolvimento e, conseqüentemente, o seu maior tamanho e melhor consistência ⁽⁷¹⁾.

A apanha de ouriços-do-mar só pode ser realizada tendo em conta o tamanho mínimo de captura, isto é, o diâmetro equatorial do animal tem de ser no mínimo 50 mm, o qual corresponde a um ouriço-do-mar adulto ⁽⁸⁹⁾. Por outro lado, existe um limite máximo de captura, na medida em que cada pessoa só pode apanhar, no máximo, 50 Kg por dia, uma vez que esta atividade é realizada por pessoas singulares e com a devida licença de apanhador ^(78,84,90).

1.4. Resistência a antimicrobianos

A emergência e a disseminação de resistências aos antimicrobianos representa uma grande ameaça à saúde e ao bem-estar de humanos e animais (espécies pecuárias e animais de companhia). A antibiorresistência (ABR) assenta na plasticidade genética das bactérias, patente na sua grande capacidade para se adaptarem e superarem fatores inibitórios, nomeadamente a grande quantidade de antibióticos usados em medicina humana, medicina veterinária, produção pecuária, aquacultura, agricultura e tecnologia alimentar. Por sua vez, globalizou-se pela mobilidade crescente de pessoas e mercadorias e pela inexistência de barreiras ambientais e ameaça eternizar-se pela estabilização funcional e molecular dos genes de antibiorresistência no genoma bacteriano ^(91,92). Esta dinâmica, apesar de ser consensualmente reconhecida, está longe de estar satisfatoriamente esclarecida, particularmente, no que concerne à importância do ambiente marinho na emergência de novos determinantes genéticos de resistência e na potencial transferência destes genes e das bactérias que os albergam, para outros biomas, incluindo o humano.

Diversos estudos ^(93–95) têm identificado nos produtos da pesca e em bivalves, bactérias multirresistentes. Adicionalmente, o consumo global destes produtos está a aumentar e a cozinha moderna revela uma apetência crescente por iguarias consumidas sem qualquer tratamento térmico ou sujeitas a um tratamento bactericida muito débil (e.g. ostras e uma variedade de pratos de sushi)⁽⁹⁶⁾. Qualquer destes géneros alimentícios representa uma fonte potencial de bactérias resistentes para os seres humanos, através do consumo ou por exposição durante o manuseio e preparação de alimentos. Conforme mencionado anteriormente, os ouriços e, em maior grau, as ostras acumulam ativamente bactérias enquanto se alimentam, adquirindo uma microbiota densa e diversa. De facto, o intestino e o hepatopâncreas das ostras proporcionam as condições favoráveis à proliferação microbiana e à transferência horizontal de genes (Fig. 1.12.), pois são periodicamente fechados e mantêm um ambiente nutritivo estável com temperaturas elevadas, bastante frequente na zona costeira intertidal ⁽⁹⁷⁾. Adicionalmente, a quitina encontrada dentro do escudo gástrico de bivalves, mostrou melhorar a transmissão horizontal de genes entre bactérias, tornando estes animais verdadeiros "*hot-spots*" na emergência de resistências transmissíveis ^(98,99).

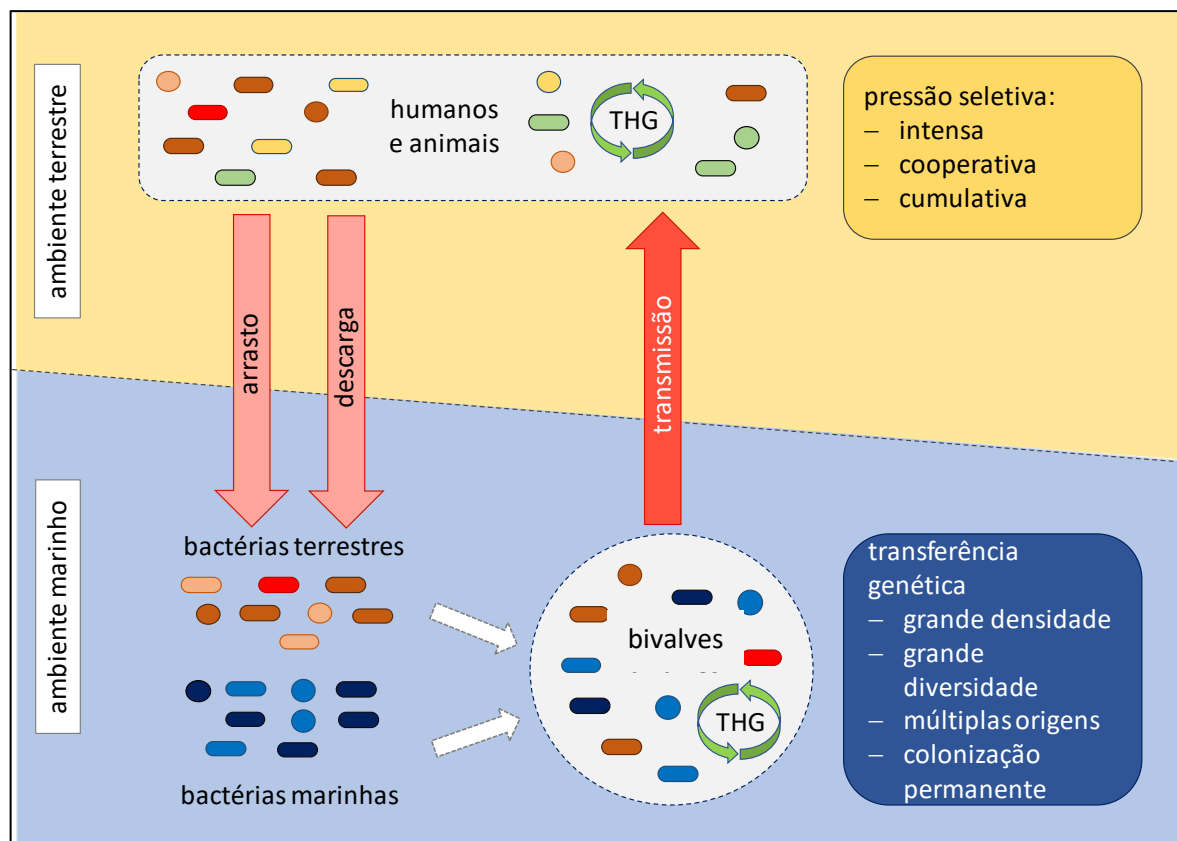


Figura 1.12. Representação gráfica dos fluxos de disseminação de bactérias entre os ambientes terrestre e aquático. Muitas destas bactérias são portadoras de genes de resistência aos antimicrobianos. Ostras e ouriços-do-mar são, entre uma grande diversidade de biótopos colonizáveis, “hot spots”, onde pode ocorrer a transferência horizontal de genes entre bactérias pertencentes a diferentes estirpes, espécies ou géneros. O consumo (enquanto alimento) destes animais é uma das vias de transmissão para o homem.

2

Objetivos

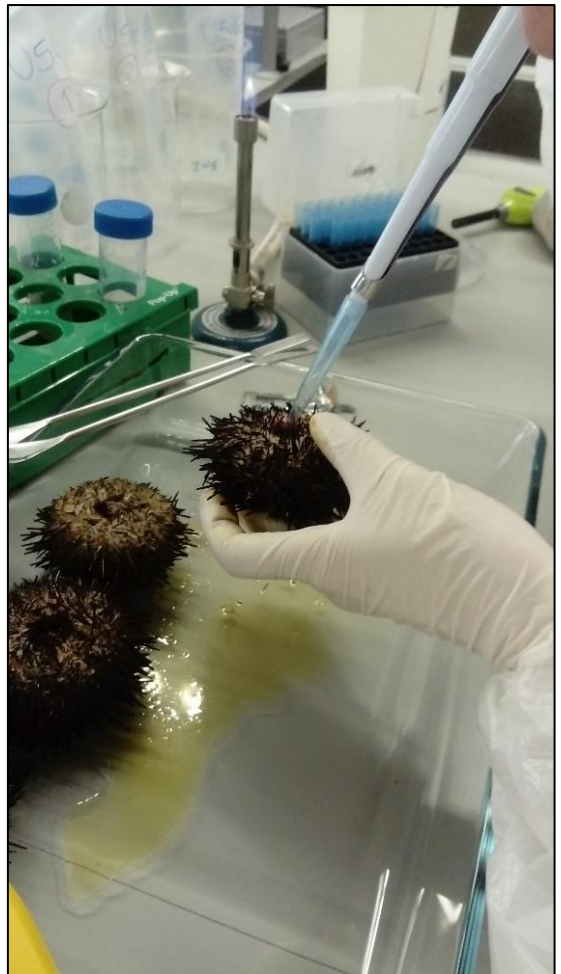
O presente estudo foi realizado com o propósito de avaliar de forma integrada a qualidade e segurança microbiológica de ostras (*Crassostrea gigas*) e de ouriços-do-mar (*Paracentrotus lividus*) ao nível da produção primária, bem como a caracterização do perfil microbiológico do habitat destas espécies.

Assim sendo, são objetivos deste trabalho:

1. Identificar as diferenças na densidade e diversidade da população bacteriana presente no meio aquático envolvente, no biofilme superficial, no conteúdo edível e nos fluidos fisiológicos destes animais marinhos;
2. Identificar as diferenças microbiológicas entre as ostras e os ouriços, bem como as variações sazonais e geográficas (estas últimas apenas em ouriços);
3. Comparar, no caso das ostras, os resultados obtidos com dados publicitados pelo IPMA no âmbito do plano de ação “Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves”;
4. Investigar a prevalência de resistências aos antimicrobianos e as características fenotípicas de isolados de *E. coli* e *Enterococcus* spp. multirresistentes e elucidar a importância das ostras e ouriços na transmissão ao homem através da cadeia alimentar desta importante ameaça à saúde pública, de acordo com o princípio "One Health".

3

Material e Métodos



3.1. Caracterização das zonas de amostragem e colheita das amostras

3.1.1. Ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*)

Entre Julho de 2016 e Maio de 2017 foram recolhidas, trimestralmente, amostras de ostra-do-Pacífico num viveiro localizado no Canal de Mira da Ria de Aveiro. A escolha da data das amostragens sazonais foi feita em função das marés e de forma a abranger as quatro estações do ano.

3.1.1.1. Canal de Mira

A Ria de Aveiro é uma laguna costeira situada no litoral centro da costa portuguesa (40°38'N, 8°45'W). Este sistema lagunar de águas pouco profundas apresenta uma rede de canais, sendo composta por quatro braços principais, o Canal de Mira, o Canal de São Jacinto-Ovar, o Canal de Ílhavo (direção Norte-Sul) e o Canal Espinheiro (direção Este-Oeste), tendo apenas uma única ligação com o oceano Atlântico, a foz da Barra (Fig. 3.1.). Tal como toda a Ria, o Canal de Mira é extremamente produtivo por causa da sua riqueza em nutrientes, apresentando ainda uma boa renovação de água devido às correntes favoráveis. Estes fatores influenciam, de forma direta, um bom crescimento dos bivalves. O clima nesta região apresenta características mediterrânicas, sendo pouco ou moderadamente húmido e com algum défice de água no verão. O local em questão encontra-se supervisionado pelo IPMA que verifica e analisa periodicamente a salubridade das zonas de produção, nomeadamente parâmetros microbiológicos, químicos e a quantidade de biotoxinas. O viveiro onde foram recolhidas as amostras encontra-se na zona RIAV2 ⁽⁴³⁾ que está referenciada como pertencente à classe B ⁽¹⁰⁰⁾.

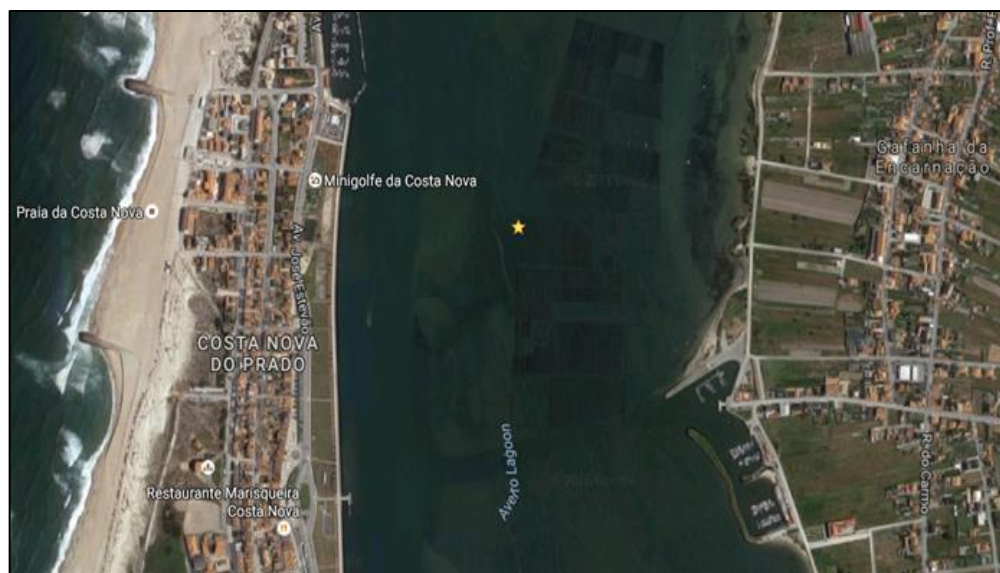


Figura 3.1. Localização do ponto de amostragem na zona de produção das ostras da empresa Bivaqua no Canal de Mira (Ílhavo).

3.1.1.2. Procedimento de amostragem

A recolha das amostras foi efetuada pelos ostreicultores durante a baixa-mar. Foram retiradas de vários sacos ostreícolas ostras com tamanho comercial (comprimento superior a 7 cm) ⁽¹⁰¹⁾, as quais foram colocadas dentro de uma mala térmica e transportadas vivas para o laboratório. O número de ostras analisadas em cada amostragem e a data das colheitas encontram-se descritos na Tabela 3.1. A par de cada recolha de ostras foi também coletada uma amostra de água no local da amostragem. Para tal, foram utilizados recipientes de plástico estéreis com capacidade total de 5 L. A análise microbiológica das amostras foi realizada no próprio dia da colheita.

Tabela 3.1. Plano das amostragens de ostra-do-Pacífico realizadas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

Amostragem	Local	Data	Nº ostras
Verão	Canal de Mira	29-07-16	20
Outono	Canal de Mira	23-11-16	24
Inverno	Canal de Mira	24-01-17	25
Primavera	Canal de Mira	04-05-17	35

3.1.1.3. Parâmetros biométricos

Após a receção das ostras no laboratório procedeu-se à avaliação de alguns parâmetros biométricos: peso vivo, comprimento máximo da concha (medido na direção ântero-posterior que é paralela ao eixo da charneira), largura máxima da concha (medida perpendicularmente ao eixo da charneira) e altura máxima da concha (medida na zona onde a espessura da concha é maior). As medições do comprimento, largura e altura da concha foram feitas com o auxílio de um paquímetro (Fig. 3.3.).

Em cada amostragem foi calculado o valor mínimo, médio e máximo, bem como o coeficiente de variação (CV) para cada um dos parâmetros analisados, usando o *software* de análise estatística *GraphPad Prism* versão 5.0. O CV é uma medida de dispersão relativa e representa o desvio padrão das amostras expresso como percentagem da média.

3.1.2. Ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*)

Entre Setembro de 2016 e Maio de 2017 foram recolhidas, trimestralmente, amostras de ouriço-do-mar em duas praias localizadas na região de Viana do Castelo: Praia de Carreço e Praia Norte. A escolha dos locais de recolha dos ouriços-do-mar resultou de estudos prévios realizados por uma equipa de investigadores do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) da

Universidade do Porto. A escolha da data das amostragens sazonais foi feita em função das marés e de forma a abranger as quatro estações do ano.

3.1.2.1. Praia de Carreço

A Praia de Carreço situa-se 7 km a norte da foz do rio Lima e 11 km a sul da desembocadura do rio Minho (41°44' 57"N, 8°51'57"W; Fig. 3.2.). Esta praia sofre, de forma direta, o efeito das ondas e das correntes costeiras, apresentando várias áreas rochosas paralelas à linha de costa com poucas dezenas de metros de extensão, às quais é possível aceder nos momentos de maré baixa. Nas zonas rochosas mais exteriores é possível encontrar covas escavadas pelos ouriços, muitas das quais ocupadas por ouriços-do-mar de pequeno e médio tamanho.

3.1.2.2. Praia Norte

A Praia Norte encontra-se a poucas centenas de metros a norte da foz do rio Lima (41°40'12" N, 8°49'60"W; Fig. 3.2.). A zona rochosa existente nesta praia é, tal como na Praia de Carreço, paralela à linha de costa. No entanto, a Praia Norte não está tão exposta às ondas e às correntes como a Praia de Carreço devido, principalmente, à presença de uma faixa de rochas que percorre a zona mais externa da praia e que é capaz de atenuar a força das ondas. Durante os períodos de maré baixa é possível observar uma enorme densidade de ouriços de grande tamanho nas zonas submergidas das bordas das rochas⁽⁸⁷⁾.

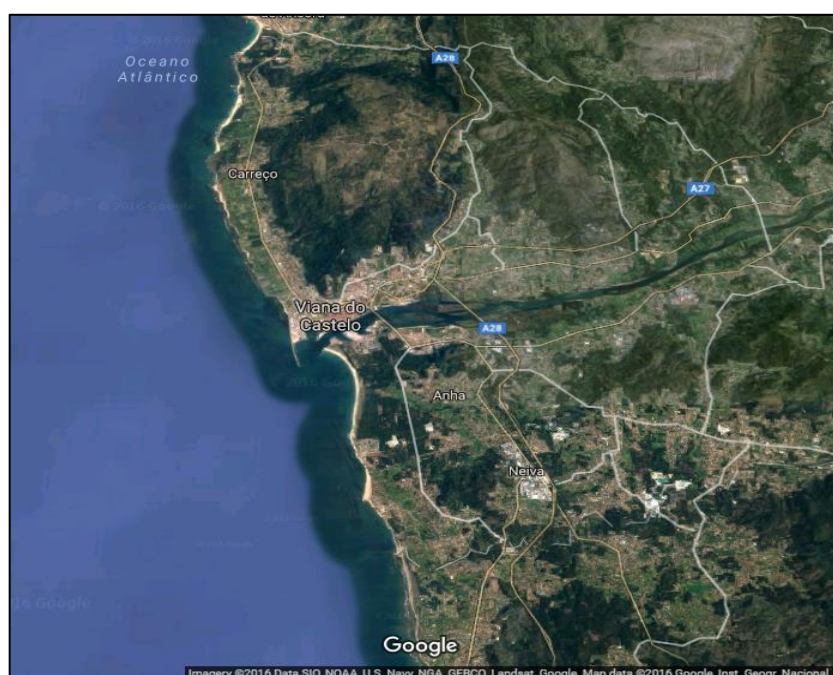


Figura 3.2. Localização dos pontos de amostragem dos ouriços na costa norte de Portugal: Praia de Carreço (a norte) e Praia Norte (a sul)

3.1.2.3. Procedimento de amostragem

A recolha das amostras foi efetuada por uma equipa especializada do CIIMAR durante a baixa-mar. Os ouriços-do-mar capturados tinham, na sua maioria, um tamanho mínimo de 5 cm de diâmetro equatorial (tamanho comercial) ⁽⁸⁹⁾. Os ouriços foram colocados dentro de uma mala térmica e transportados vivos para o laboratório. O número de ouriços analisados em cada amostragem e a data e o local das colheitas estão descritos na Tabela 3.2. A par de cada recolha foi também coletada uma amostra de água no local da amostragem. Para tal, foram utilizados recipientes de plástico estéreis com capacidade total de 5 L. A análise microbiológica das amostras foi realizada no dia da colheita.

Tabela 3.2. Plano das amostragens de ouriço-do-mar realizadas nas Praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.

Amostragem	Local	Data	Nº ouriços
Verão	Praia de Carreço	01-09-16	10
	Praia do Norte	02-09-16	10
Outono	Praia de Carreço	15-11-16	10
	Praia do Norte	16-11-16	10
Inverno	Praia de Carreço	15-02-17	20
	Praia do Norte	16-02-16	20
Primavera	Praia de Carreço	25-05-17	19
	Praia do Norte	26-05-16	20

3.1.2.4. Parâmetros biométricos

Após a receção das amostras no laboratório os ouriços foram pesados e o diâmetro equatorial foi medido de acordo com o indicado na Figura 3.4. Para cada amostragem foi calculado o valor mínimo, médio e o CV de cada um dos parâmetros biométricos analisados, tal como descrito para as amostras de ostras.

3.2. Preparação das amostras

3.2.1. Ostra-do-Pacífico

Após a avaliação dos parâmetros biométricos procedeu-se à obtenção das diversas frações para a análise microbiológica: i) biofilme superficial; ii) líquido intravalvar; iii) hemolinfa e iv) conteúdo edível (Fig. 3.3.).

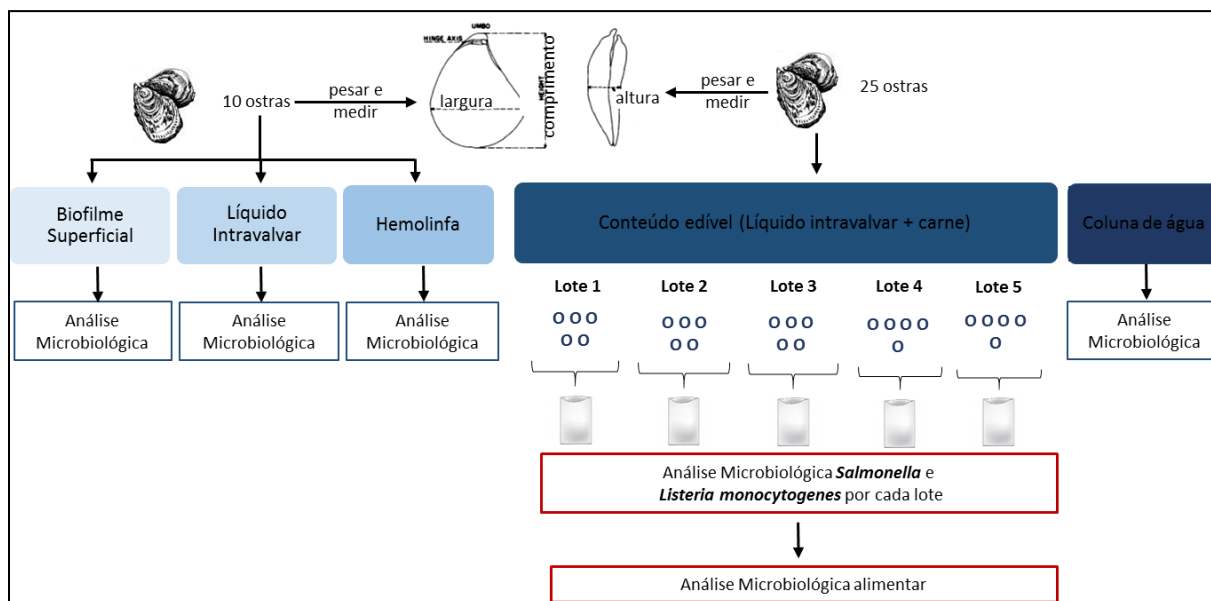


Figura 3.3. Protocolo utilizado no processamento e monitorização microbiológica das amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

i) Biofilme superficial

Para obtenção do biofilme superficial procedeu-se à lavagem de 10 ostras com 100 mL de água peptonada tamponada (APT, Biokar Diagnostics) com o auxílio de duas escovas de dentes estéreis. O biofilme foi filtrado utilizando uma gaze estéril, de forma a reter pequenos pedaços da concha.

ii) Líquido intravalvar

Para a recolha do líquido intravalvar de 10 ostras, procedeu-se à abertura parcial das mesmas, na zona do umbo, com uma faca estéril, para que o líquido intravalvar caísse dentro um funil de vidro com uma gaze e fosse recolhido para um saco de *stomacher* estéril.

iii) Hemolinfa

A hemolinfa de 10 ostras foi recolhida diretamente do músculo adutor com uma seringa estéril.

iv) Conteúdo edível

Para a análise microbiológica alimentar utilizaram-se 25 ostras que foram lavadas em água corrente e secas com papel absorvente antes de se proceder à sua abertura para recolha do conteúdo edível (líquido intravalvar e carne). As conchas foram abertas pela zona do umbo com uma faca estéril e o conteúdo edível foi recolhido para um saco de *stomacher* e homogeneizado durante 1 minuto no *Stomacher 400®* (Circulator). De seguida, foram pesados asepticamente 25 g de conteúdo edível aos quais foram adicionados 225 mL de APT, de acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO) 6887-3:2003 ⁽¹⁰²⁾. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 hora para

revitalizar as células debilitadas. O mesmo processo foi repetido em paralelo e outros 25 g foram pesados, aos quais foram adicionados 225 mL de *Half Fraser broth* (Biokar Diagnostics) para a pesquisa de *L. monocytogenes*, de acordo com a norma ISO 6887-3:2003. Contudo, no decorrer deste trabalho, a pesquisa de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* no conteúdo edível (análise microbiológica alimentar) passou a ser realizada por lotes (amostragem de Primavera). Aquando da obtenção do conteúdo edível, este passou a ser separado em 5 lotes de 5 animais, sendo a diluição em APT e *Half Fraser Broth* realizada individualmente para cada lote (Fig. 3.3.). Assim, a pesquisa dos restantes microrganismos passou a ser feita num número maior de animais.

Após obtenção das diferentes frações das ostras foram preparadas diluições seriadas, de acordo com a norma portuguesa (NP) 3005:1985, até à diluição considerada necessária para se proceder aos ensaios de análise microbiológica (Tabelas S.2 e S.3 do Anexo I).

3.2.2. Ouriço-do-mar

Após a avaliação dos parâmetros biométricos procedeu-se à obtenção das diversas frações para análise microbiológica: i) biofilme superficial; ii) líquido celómico; iii) conteúdo edível (Fig. 3.4.).

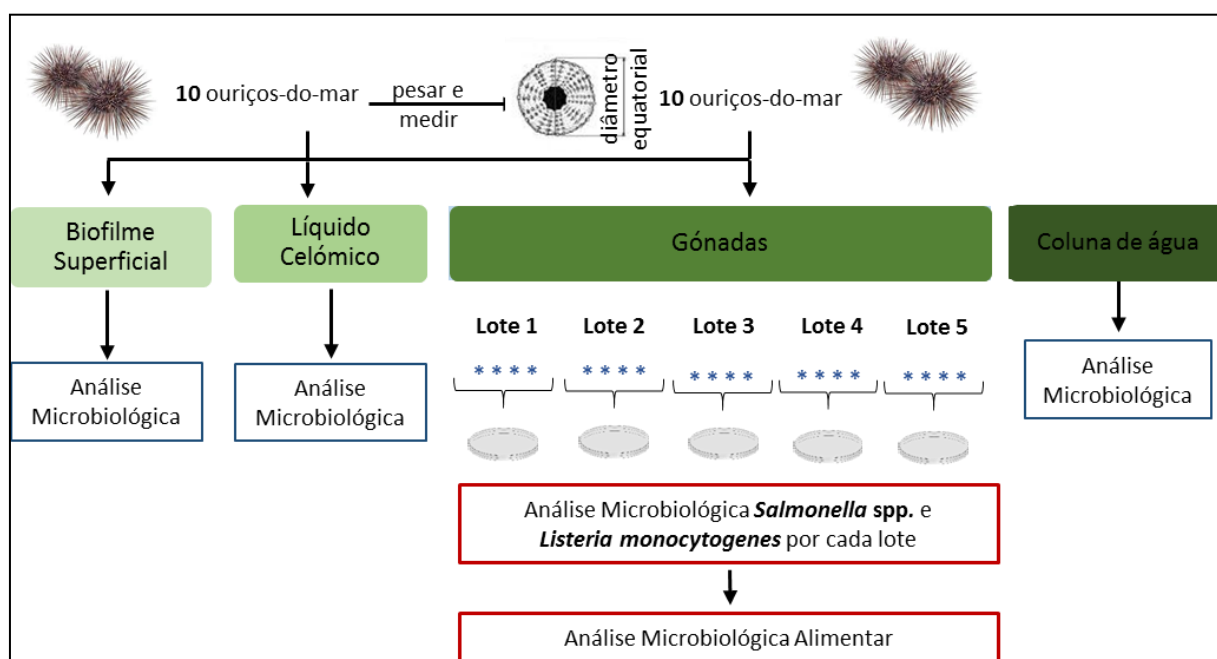


Figura 3.4. Protocolo utilizado no processamento e monitorização microbiológica das amostras recolhidas nas Praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.

i) Biofilme superficial

Tal como descrito para as ostras, o biofilme superficial foi obtido a partir da lavagem da superfície de 10 ouriços-do-mar em 100 mL de APT (Fig. 3.5. A).

ii) Líquido celómico

Para a recolha do líquido celómico realizou-se um pequeno corte com a lâmina de um bisturi junto à lanterna de Aristóteles em 10 ouriços-do-mar, e com uma micropipeta, este foi retirado para um tubo estéril (Fig. 3.5. B).

iv) Conteúdo edível

A recolha do conteúdo edível (gónadas) de 10 ouriços foi realizada com o auxílio de uma faca estéril, para quebrar o exoesqueleto do animal, e uma espátula esterilizada (Fig. 3.5. C-F). As gónadas foram colocadas num saco de *stomacher* e homogeneizadas durante 1 minuto no *Stomacher 400®*. Após a homogeneização das gónadas, 25 g foram pesados assepticamente para um saco de *stomacher*, aos quais foram adicionados 225 mL de APT, de acordo com o descrito na ISO 6887-3:2003 ⁽¹⁰²⁾. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 hora para revitalizar as células debilitadas. Outros 25 g de conteúdo edível foram pesados para um novo saco, aos quais foram adicionados 225 mL de *Half Fraser broth* para a pesquisa de *L. monocytogenes*, de acordo com a ISO 6887-3:2003 ⁽¹⁰²⁾. Tal como no caso da ostra-do-Pacífico, a pesquisa de *Salmonella* spp. e de *L. monocytogenes* no conteúdo edível dos ouriços (análise microbiológica alimentar) passou a ser realizada em 5 lotes de 4 animais (amostragens de inverno e de primavera; Fig. 3.4.).

Após a obtenção das diferentes frações dos ouriços foram preparadas diluições seriadas, de acordo com a NP 3005:1985, até à diluição considerada necessária para se proceder aos ensaios de análise microbiológica (Tabelas S.2 e S.3 do Anexo I).

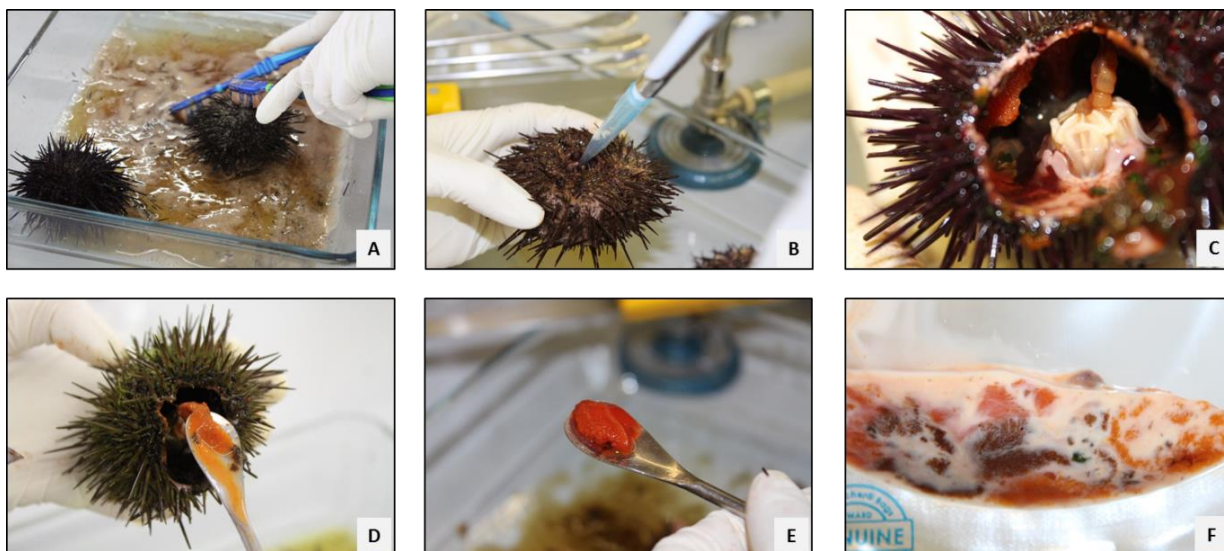


Figura 3.5. Processamento das amostras de ouriço-do-mar. A) Recolha do biofilme superficial; B) Coleta do líquido celómico; C) Anatomia interna do ouriço-do-mar; D e E) Remoção das gónadas; F) Gónada.

3.2.3. Coluna de água

A análise microbiológica da água foi realizada pelas técnicas de incorporação e microfiltração por vácuo. Na técnica de microfiltração foram usadas membranas de nitrato de celulose com um poro de 0,45 µm (Sartorius Stedim).

3.3. Análise da qualidade e segurança microbiológica

3.3.1. Análise microbiológica alimentar

Nas amostras de conteúdo edível de ostras e de ouriços foi feita a pesquisa e/ou quantificação dos seguintes microrganismos: i) microrganismos aeróbios mesófilos totais (crescimento a 30 °C) e microrganismos aeróbios psicrófilos (crescimento a 7 °C); ii) Enterobacteriaceae; iii) *E. coli*; iv) *Enterococcus* spp.; v) estafilococos coagulase-positiva; vi) *C. perfringens*; vii) *Salmonella* spp.; viii) *L. monocytogenes* e ix) bolores e leveduras. A pesquisa e/ou quantificação de alguns dos microrganismos avaliados não são obrigatórias no âmbito do Regulamento (CE) n.º 1441/2007 que altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Exemplo disso são a contagem de microrganismos aeróbios totais, de *Enterococcus* spp. e de bolores e leveduras.

i) Microrganismos aeróbios totais

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais foi efetuada com base na ISO 4833:2003 ⁽¹⁰⁴⁾. As amostras foram inoculadas por incorporação em *Plate Count Agar* (PCA, Biokar Diagnostics) e incubadas a 30 °C durante 72 horas. No caso dos microrganismos psicrófilos, o protocolo seguido foi semelhante, mas a incubação das placas foi feita a 7 °C durante 7 dias (Fig. 3.6. A).

ii) Enterobacteriaceae

A contagem de Enterobacteriaceae foi efetuada de acordo com a norma ISO 21528-2:2004 ⁽¹⁰⁵⁾. As amostras foram incorporadas em meio de cultura *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG, Biokar Diagnostics) e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Este meio possui cristal violeta e sais biliares que inibem o crescimento das bactérias Gram-positivas. As Enterobacteriaceae rapidamente fermentam a glucose do meio, reduzindo o pH, originando colónias roxas/rosa devido à presença de vermelho neutro e cristal violeta. Estas colónias são normalmente rodeadas por halos roxos devido à precipitação dos sais biliares. Um mínimo de 5 colónias isoladas típicas (quando possível) foi confirmado por testes bioquímicos (Tabela 3.3.). As contagens iniciais foram corrigidas de acordo com os resultados dos testes bioquímicos.

Tabela 3.3. Testes bioquímicos para confirmação dos isolados de Enterobacteriaceae ⁽⁵⁹⁾

Microrganismo	Gram	Oxidase	Hek ^a	TSI ^b				MIU ^g			Cit ^k	LCD ^l	OCD ^m
				Glu ^c	La ^d	Gás ^e	H ₂ S ^f	Indol ^h	Urease ⁱ	Mob ^j			
Enterobacteriaceae	B-	-	+	+	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>E. coli</i>	B-	-	colónias laranja	+	+	+	-	+	-	+	-	V	V
<i>Salmonella</i> spp.	B-	-	colónias azuis/verdes	+	-	+	+	-	-	V	+	+	+

^a Crescimento em *Hektoen Enteric Agar* (HEK); ^b *Triple Sugar Iron Agar* (TSI, Oxoid); ^c Fermentação da glucose; ^d Fermentação da lactose; ^e Produção de gás; ^f Produção de sulfureto de hidrogénio; ^g *Mobility Indole Urea Agar* (Liofilchem); ^h Produção de indol; ⁱ Presença de urease; ^j Detecção de mobilidade; ^k Meio de Citrato de *Cimmons* (*Cimmons Citrate Agar*, Liofilchem); ^l Pesquisa de lisina descarboxilase (*Lysine Decarboxylase broth*, Liofilchem); ^m Pesquisa de ornitina descarboxilase (*Ornithine Decarboxylase Broth*, Liofilchem); B – bacilo Gram-negativo; V – variável.

iii) *Escherichia coli*

A contagem de *E. coli* pelo método do NMP foi efetuada de acordo com a norma ISO 16649-3:2005 ⁽¹⁰⁶⁾. Neste método as amostras são incorporadas num meio de cultura líquido com glutamato modificado. Foram incorporados 1 g de amostra em 5 tubos com caldo de glutamato concentração dupla, 0,1 g de amostra em 5 tubos com caldo de glutamato e 0,01 g de amostra em 5 tubos com caldo de glutamato (Fig. 3.6. B). O número de tubos e de diluições está também de acordo com o recomendado no

Regulamento (CE) nº 854/2004 de 29 de Abril ⁽⁴⁶⁾; podem, porém ser utilizados métodos alternativos se tiverem sido validados com base neste método de referência em conformidade com os critérios da norma EN/ISO 16140 ⁽¹⁰⁷⁾. Os tubos foram incubados a 44 °C durante 24 horas. Após a incubação, os tubos que apresentaram coloração amarela foram esgotados em placas de *Tryptone Bile X-glucuronide* (TBX, Biokar Diagnostics), que foram incubadas a 44 °C durante 24 horas. As colónias típicas, que após confirmação por testes bioquímicos são identificadas como *E. coli* correspondem a um determinado número de tubos de glutamato positivos, o que permite calcular o NMP tendo em conta a tabela aprovada na ISO 7218:2007 ⁽¹⁰⁸⁾.

iv) *Enterococcus* spp.

A contagem de *Enterococcus* spp. foi efetuada pelo método de incorporação em *Agar Slanetz and Bartley* (SB, Biokar Diagnostics). Este meio contém azida, que inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas, e *triphenyltetrazolium chloride* (TTC), que funciona como indicador do crescimento bacteriano – o TTC é reduzido a um precipitado de formazan dentro das células. Após incubação a 37 °C durante 48 horas as colónias típicas rosa-carne a avermelhadas/carmim foram contadas e um mínimo de 5 isolados foi confirmado em *Agar Kanamicin-esculin Azida* (KAA, Oxoid). O meio KAA para além de agentes seletivos e inibitórios possui um indicador que permite detetar a hidrólise da esculina: quando a esculina é hidrolisada aparecem halos negros à volta das colónias devido à formação de compostos de ferro-fenol. Os enterococos têm atividade esculina rápida que se verifica em 4 horas.

v) *Estafilococos* coagulase-positiva

A técnica de deteção e enumeração de estafilococos coagulase-positiva foi adaptada da ISO 6888-3:2003 ⁽¹⁰⁹⁾. A amostra foi semeada num meio seletivo sólido *Baird-Parker* com fibrinogénio de plasma de coelho (BP, Biokar Diagnostics) e incubada a 37 °C durante 24 a 48 horas. Este meio possui glicina, lítio e telurite que inibem o crescimento da maioria das bactérias exceto o *Staphylococcus* spp. Os estafilococos reduzem a telurite formando colónias cinzentas/pretas brilhantes. Se à volta destas colónias se formarem halos transparentes isso é resultado da atividade lipolítica (lecitinase) que se correlaciona bem com *Staphylococcus* coagulase-positiva. Com uma incubação mais prolongada há tendência para os halos ficarem opacos devido à ação de uma lipase.

vi) *Clostridium perfringens*

A contagem de *Clostridium perfringens* foi feita de acordo com a ISO 7937:2004 ⁽¹¹⁰⁾. A sementeira foi realizada por incorporação em meio *Tryptose Sulphide Cycloserine* (TSC, Oxoid). As placas foram incubadas em anaerobiose durante 24 horas a 37°C. As colónias típicas foram inoculadas em tioglicolato (Frilabo) e incubadas em anaerobiose a 37°C. Posteriormente foram transferidas para um tubo com

meio lactose sulfito (LS, Frilabo) com tubo de Durham e incubadas a 46°C em banho de água durante 24 horas. Os tubos que possuíam gás em mais de um quarto do tubo de *Durham* e com precipitado negro foram considerados positivos (Fig. 3.6. D).

vii) *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi feita de acordo com a ISO 6579:2002 ⁽¹¹¹⁾. A amostra foi pré-enriquecida a 37 °C durante 18 horas em meio líquido não seletivo (APT). De seguida foi enriquecida em i) meio semi-sólido selectivo *Rappaport-Vassiliadis medium semisolid modified* (MSRV, Biokar Diagnostics) a 41,5 °C durante 24 horas e ii) meio líquido *Muller-Kauffmann Tetratationato-Novobiocina* (MKTn, Biokar Diagnostics) a 37 °C durante 24 horas (Fig. 3.6. E e F). Após o enriquecimento i e ii, as amostras foram esgotadas no meio seletivo *Hektoen enteric agar* (HEK, Biokar Diagnostics). Neste meio as colónias de *Salmonella* spp. são tipicamente transparentes azuis-esverdeadas com um precipitado negro. As colónias típicas foram confirmadas por testes bioquímicos (Tabela 3.3). Nos isolados estudados em que os resultados dos testes bioquímicos foram compatíveis com *Salmonella* spp. foram realizados testes bioquímicos complementares (*RapID ONE*, Thermo Scientific™ Remel™ RapID™ ERIC™) e testes de aglutinação (*Salmonella latex kit*, Liofilchem; Fig. 3.6. I).

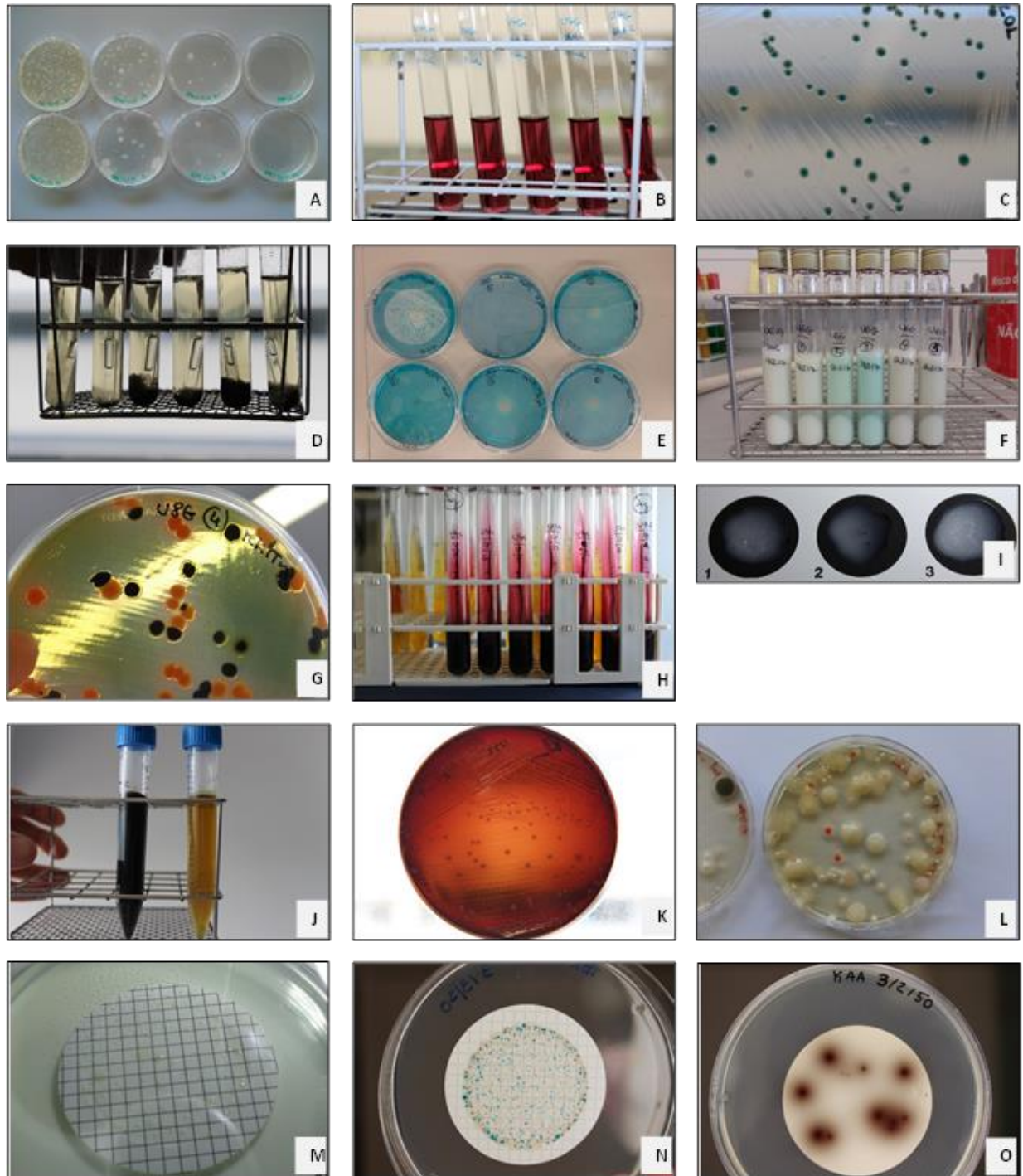


Figura 3.6. Microrganismos estudados em diferentes meios de cultura. A) Placas de PCA com crescimento de microrganismos aeróbios; B) Tubos de glutamato modificado para pesquisa de *E. coli* pelo método do NMP; C) Colônias de *E. coli* em agar TBX; D) Tubos de lactose sulfito positivos utilizados na pesquisa de *C. perfringens* (tubo 2 a 6); E) Meio de MSRVR para a pesquisa de *Salmonella* spp.; F) Tubos de MKTTn para enriquecimento de *Salmonella* spp.; G) Placa de agar HEK com colônias de *Salmonella* spp.; H) Tubos de TSI com isolados de *Salmonella* spp.; I) Teste de aglutinação para a identificação de *Salmonella* spp. com resultado positivo (1 e 3) e negativo (2); J) Tubos com caldo Fraser para a pesquisa de *L. monocytogenes*; K) Placa de Palcam negativa para *L. monocytogenes*; L) Placas de oxytetracycline glucose agar (OGA) com bolores e leveduras; M) Contagem de microrganismos totais por microfiltração em agar PCA; N) Contagem de *E. coli* por microfiltração em agar TBX; O) Confirmação das colônias de *Enterococcus* spp. pesquisadas por microfiltração em agar KAA.

viii) *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi executada com base na ISO 11290-1:2004 ⁽¹¹²⁾. A amostra foi enriquecida a 30 °C durante 24 horas em meio líquido em *Half-Fraser broth*, seguido de um enriquecimento seletivo em *Fraser broth* (Biokar Diagnostics) a 37 °C durante 48 horas (Fig. 3.6 J). A amostra enriquecida foi então esgotada em meio seletivo *Palcam* (Biokar Diagnostics; Fig. 3.6. K). O meio *Palcam* é altamente seletivo devido à presença de cloreto de lítio, ceftazidima, polimixina B e hidrocloreto de acriflavina. Neste meio a *L. monocytogenes* hidrolisa a esculina formando um halo preto à volta das colónias amarelo-esverdeadas.

ix) Bolores e leveduras

Para a enumeração seletiva de bolores e leveduras, com base na NP 3277-1:1987 ⁽¹¹³⁾, realizou-se a sementeira de 0,02 g e 0,001 g de amostra, por espalhamento, em meio sólido *Oxytetracycline Glucose Agar* (OGA, Biokar Diagnostics). As placas de OGA foram incubadas a 25 °C durante 5 dias. Este meio favorece o crescimento de leveduras e fungos devido à presença de glucose e extrato de levedura na sua composição (Fig. 3.6. L). A adição de oxitetraciclina inibe o crescimento da maioria das bactérias.

3.4. Análise microbiológica do habitat, do biofilme superficial e dos fluidos orgânicos

3.4.1. Biofilme superficial, líquido intravalvar, hemolinfa e líquido celómico

Nas amostras de biofilme superficial das ostras e dos ouriços-do-mar, líquido intravalvar e hemolinfa das ostras e líquido celómico dos ouriços-do-mar procedeu-se à pesquisa e/ou quantificação dos seguintes microrganismos: i) microrganismos aeróbios mesófilos totais (crescimento a 30 °C); ii) bactérias heterotróficas marinhas; iii) Enterobacteriaceae; iv); *E. coli* β-glucuronidase positiva e v) *Enterococcus* spp.

i) Microrganismos aeróbios mesófilos totais

A quantificação dos microrganismos mesófilos totais foi feita como descrito para o conteúdo edível (análise microbiológica alimentar).

ii) Bactérias heterotróficas marinhas

A contagem das bactérias heterotróficas marinhas viáveis foi efetuada pelo método de incorporação em meio Agar Marinho (Pronadisa). As placas foram incubadas a 21 °C durante 48 horas. Este meio possui alto teor de sal, o que simula a água do mar, permitindo o crescimento deste tipo de bactérias.

iii) Enterobacteriaceae

A contagem de Enterobacteriaceae foi realizada por espalhamento em meio de *MacConkey* (Biokar Diagnostics). Este meio possui sais biliares e cristal violeta como agentes seletivos. Para além disso, contém lactose, o que permite verificar a fermentação deste açúcar. Um mínimo de 5 colónias isoladas (quando possível) foi confirmado por testes bioquímicos (Tabela 3.3.) As contagens iniciais foram corrigidas de acordo com os resultados dos testes bioquímicos.

iv) *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva

A contagem de *E. coli* foi efetuada de acordo com a norma ISO 16649-2:2001 ⁽¹¹⁴⁾ que descreve o procedimento de inoculação por incorporação em agar de TBX. O agar TBX é um meio de cultura seletivo e diferencial usado para detetar e enumerar *E. coli* β -glucuronidase positiva. A *E. coli* absorve o substrato cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucuronato) e a glucuronidase quebra esse substrato libertando um cromóforo (azul) que se acumula dentro das células. As colónias típicas são azuis com um halo branco. Após a incubação a 44 °C durante 24 horas, foi efetuada a contagem das colónias típicas nas placas de TBX. Um mínimo de 5 isolados (quando possível) típicos foi confirmado por testes bioquímicos. As contagens iniciais foram corrigidas de acordo com os resultados dos testes bioquímicos.

v) *Enterococcus* spp.

A deteção e quantificação de *Enterococcus* spp. foi feita como descrito na secção da análise microbiológica alimentar.

3.4.2. Conteúdo edível

Para efeitos de comparação das diferentes frações das ostras e dos ouriços analisadas, a deteção e a quantificação de bactérias heterotróficas marinhas, Enterobacteriaceae e *E. coli* β -glucuronidase positiva foi também feita nas amostras de conteúdo edível utilizando a mesma metodologia descrita para as restantes amostras.

O método de inoculação das placas, a quantidade de amostra inoculada, as diluições realizadas, os meios de cultura utilizados e as temperaturas e tempos de incubação utilizados encontram-se descritos nas Tabelas S.2 e S.3 do Anexo I.

3.4.3. Coluna de água

Nas amostras de água procedeu-se à pesquisa e/ou quantificação dos seguintes microrganismos: i) microrganismos aeróbios totais com crescimento a 22 °C e a 37 °C; ii) bactérias heterotróficas marinhas; iii) *E. coli* β -glucuronidase positiva; iv) *Enterococcus* spp. e v) *Salmonella* spp.

i) Microrganismos aeróbios totais

A contagem do número de microrganismos aeróbios totais com crescimento a 22 °C e a 37 °C foi realizada pelo método de incorporação de acordo com a ISO 6222:1999 ⁽¹¹⁵⁾ (Fig. 3.6. M).

ii) Bactérias heterotróficas marinhas

A quantificação de bactérias heterotróficas marinhas viáveis foi feita usando uma metodologia semelhante à descrita para as restantes amostras.

iii) *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva

A contagem de *E. coli* β -glucuronidase positiva foi feita pelos métodos de incorporação e microfiltração (Fig. 3.6. N).

iv) *Enterococcus* spp.

A quantificação de *Enterococcus* spp. foi efetuada pelos métodos de incorporação e microfiltração de acordo com a ISO 7899-2:2000 ⁽¹¹⁶⁾ (Fig. 3.6. O).

v) *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada por microfiltração de acordo com a ISO 19250:2010 ⁽¹¹⁷⁾. O filtro resultante da filtração de 1 L de água foi enriquecido em meio líquido não seletivo (APT) durante 18 horas a 37 °C, seguindo-se o processamento da amostra como descrito para o conteúdo edível das ostras e dos ouriços-do-mar.

O método de inoculação das placas, a quantidade de amostra inoculada, as diluições realizadas, os meios de cultura utilizados e as temperaturas e tempos de incubação utilizados encontram-se descritos na Tabela S.1 do Anexo I.

3.5. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

3.5.1. Antibiógramas

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados estudados foi realizado pelo método de Kirby-Bauer (método de difusão em disco) seguindo as indicações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ⁽¹¹⁸⁾. Uma suspensão com 0,5 McFarland em APT foi inoculada por sementeira em toalha em placas com meio *Mueller-Hinton* (Biokar Diagnostics) com 4 mm de espessura. Os discos de antibiótico (Oxoid) foram depositados na placa e esta foi incubada a 37 °C durante 18 horas. Após a incubação, os halos de inibição foram medidos com um paquímetro e a interpretação dos mesmos foi realizada de acordo com o CLSI. Os antibióticos testados nos isolados de *E. coli* foram: ampicilina (AMP, 10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 30 µg), cefalotina (CEF, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), tobramicina (TOB, 10 µg), amicacina (AMK, 30 µg), estreptomicina (STR, 10 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), doxiciclina (DOX, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), ácido nalidíxico (NAL, 30 µg), trimetoprima/sulfametoxazole (SXT, 25 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), nitrofurantoína (NIT, 300 µg), imipenema (IMP, 10 µg). Os antibióticos testados nos isolados de *Enterococcus* spp. foram: ampicilina (10 µg), penicilina (PEN, 10 unidades), teicoplanina (TEC, 30 µg), eritromicina (ERY, 15 µg), doxiciclina (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (120 µg), ciprofloxacina (5 µg), nitrofurantoína (300 µg), rifampicina (RIF, 5 µg), fosfomicina (FOF, 200 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), vancomicina (VAN, 30 µg), quinupristina/dalfopristina (Q-D, 15 µg), linezolida (LZD, 30 µg).

3.5.2 Classificação das bactérias multirresistentes

A classificação dos perfis de resistências adquiridas dos isolados de *E. coli* e *Enterococcus* spp. foi feita de acordo com os critérios propostos por Magiorakos *et al.* (2012) ⁽¹¹⁹⁾, com algumas modificações (Tabelas 3.4. e 3.5.). Foram classificados como multirresistente (MDR) os isolados com resistência adquirida a pelo menos um agente antimicrobiano de 3 ou mais categorias diferentes.

Tabela 3.4. Categorias de agentes antimicrobianos e antibióticos testados para classificar os isolados de *E. coli* como MDR. Adaptado de Magiorakos *et al.* (2012) ⁽¹¹⁹⁾

Classe	Antibiótico	Sensibilidade
Penicilinas	Ampicilina	R/S
Penicilinas + inibidores de β-lactamases	Amoxicilina + Ácido clavulânico	R/S
Penicilinas anti-<i>Pseudomonas</i> spp. + inibidores de β-lactamases	Ticarcilina-ácido clavulânico	Não testado
	Piperacilina-tazobactam	Não testado
Cefalosporinas 1ª e 2ª geração (espectro não alargado)	Cefalotina	R/S
Cefalosporinas 3ª e 4ª geração (espectro alargado)	Cefotaxima	R/S
	Ceftazidima	R/S
Cefamicinas	Cefoxitina	
Cefalosporinas anti-MRSA	Ceftarolina	utilizado apenas em <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. oxytoca</i> Não testado
Monobactâmicos	Aztreonam	R/S
Carbapenemas	Imipenema	R/S
Polimixinas	Colistina	Não testado
Aminoglicosídeos	Gentamicina	R/S
	Tobramicina	R/S
	Amicacina	R/S
	Estreptomicina	R/S
Quinolonas	Ácido nalidíxico	R/S
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	R/S
Inibidores do folato	Trimetoprima-sulfametoxazole	R/S
Glicilciclinas	Tigeciclina	Não testado
Fenicóis	Cloranfenicol	R/S
Ácido fosfónico	Fosfomicina	R/S
Tetraciclinas	Tetraciclina	R/S
	Doxiciclina	R/S
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	R/S

R - resistente; S - sensível

Tabela 3.5. Categorias de agentes antimicrobianos e antibióticos testados para classificar os isolados de *Enterococcus* spp. como MDR. Adaptado de Magiorakos *et al.* (2012) ⁽¹¹⁹⁾

Classe	Antibiótico	Sensibilidade
Aminoglicosídeos (excepto estreptomicina)	Gentamicina (alta concentração)	R/S
	Estreptomicina (alta concentração)	Não testado
Penicilinas	Penicilina	R/S
	Ampicilina	R/S
Carbapenemas	Imipenema	<i>E. faecium</i> é intrinsecamente resistente Não testado
	Meropenema	Não testado
	Doripenema	Não testado
Glicopéptidos	Vancomicina	<i>E. gallinarum</i> e <i>E. casseliflavus</i> são intrinsecamente resistentes R/S
	Teicoplanina	R/S
Glicilciclina	Tigeciclina	Não testado
Lipopéptidos	Daptomicina	Não testado
Macrólidos	Eritromicina	R/S
Tetraciclina	Tetraciclina	R/S
	Doxiciclina	R/S
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	R/S
Nitrofurantoína	Nitrofurantoína	R/S
Ansamicinas	Rifampicina	R/S
Fosfomicinas	Fosfomicina	R/S
Fenicolis	Cloranfenicol	R/S
Estreptograminas	Quinupristina-dalfopristina	<i>E. faecalis</i> é intrinsecamente resistente R/S
Oxazolidinonas	Linezolid	R/S

R - resistente; S - sensível

4 Resultados e discussão



4.1. Caracterização das amostras

4.1.1. Ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*)

Assumindo que os lotes de ostras avaliados neste estudo tinham tempos de desenvolvimento semelhantes, os parâmetros biométricos avaliados (Tabela 4.1.) sugerem que o inverno possa ser a estação mais favorável para o crescimento destes bivalves.

Tabela 4.1. Variação sazonal dos parâmetros biométricos analisados nas amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

Peso (g)					
	Nº ostras	Média	Máx.	Mín.	CV (%)
Verão	20	72,1	103,2	55,7	15,3
Outono	24	76,9	88,1	62,9	9,8
Inverno	25	87,6	131,7	65,9	17,9
Primavera	35	56,9	67,0	49,0	8,9
Comprimento (cm)					
	Nº ostras	Média	Máx.	Mín.	CV (%)
Verão	20	8,5	9,6	7,3	9,3
Outono	24	9,8	11,7	7,9	10,1
Inverno	25	10,2	12,7	3,6	16,0
Primavera	35	8,4	9,8	7,2	9,4
Largura (cm)					
	Nº ostras	Média	Máx.	Mín.	CV (%)
Verão	20	5,1	6,1	3,9	10,6
Outono	24	5,0	6,0	4,1	9,6
Inverno	25	5,0	6,2	3,8	12,1
Primavera	35	4,7	6,1	3,6	12,4
Altura (cm)					
	Nº ostras	Média	Máx.	Mín.	CV (%)
Verão	20	2,7	3,3	1,9	14,4
Outono	24	3,0	4,0	2,1	15,7
Inverno	25	3,0	3,9	2,6	10,9
Primavera	35	2,5	3,5	1,6	14,1

CV – coeficiente de variação

O crescimento das ostras pode ser afetado por diversos parâmetros como a salinidade e a temperatura da água, bem como a disponibilidade e a qualidade do alimento. Na Ria de Aveiro estes parâmetros tendem a sofrer flutuações consoante o regime de marés e o caudal do rio Vouga. Porém, a espécie *C. gigas* tem uma boa capacidade de resistência a estas variações ambientais acabando por beneficiar de um regime de correntes favoráveis à mobilização, a partir do leito, de uma grande quantidade de sedimentos ricos em nutrientes⁽⁶⁸⁾.

Durante os meses mais frios do ano, nomeadamente entre novembro e março, o conteúdo edível da ostra torna-se mais espesso e mais pesado devido à maior abundância de alimento e à diminuição da

temperatura da água ⁽¹²⁰⁾. Contrariamente, no verão e no início do outono, o desenvolvimento do músculo é reduzido, principalmente, devido ao aumento da temperatura da água e à desova, podendo ser agravado pela escassez de nutrientes. No outono, a parte edível das ostras encontra-se menos espessa, refletindo a menor disponibilidade de nutrientes durante o verão e o esforço metabólico para o desenvolvimento de células germinativas nas gónadas.

O desenvolvimento da concha é influenciado pelas condições ambientais, isto é, salinidades inferiores ou superiores a 18 e 32 ppm, bem como temperaturas muito baixas influenciam negativamente o crescimento da concha e, assim, o índice de tamanho comercial, que deverá ser sempre superior a 7 cm⁽⁶⁴⁾.

4.1.2 Ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*)

Spirlet *et al.* (1998) relataram um padrão de variação do índice de desenvolvimento das gónadas semelhante ao obtido na avaliação realizada neste estudo (Tabela 4.2. e Tabela 4.3.). Os mesmos autores revelaram também que o desenvolvimento das gónadas de *P. lividus* ocorre durante os meses mais frios e com menor fotoperíodo do ano ⁽⁸⁶⁾.

Tabela 4.2. – Variação sazonal dos parâmetros biométricos analisados nas amostras de ouriço-do-mar recolhidos na Praia de Carreço em Viana do Castelo.

Peso (g)					
	Nº ouriços	Média	Máx.	Mín.	CV (%)
Verão	10	77,2	143,4	24,7	46,3
Outono	10	98,9	135,1	64,5	23,0
Inverno	20	91,6	136,0	56,0	26,7
Primavera	19	60,4	107,5	31,5	32,1
Diâmetro equatorial (cm)					
	Nº ouriços	Média	Máx.	Mín.	CV (%)
Verão	10	5,9	7,6	4,0	19,5
Outono	10	6,7	7,5	5,8	8,4
Inverno	20	6,2	7,3	5,2	9,7
Primavera	19	5,7	7,2	4,6	10,6

CV – coeficiente de variação

Tabela 4.3. – Variação sazonal dos parâmetros biométricos analisados nas amostras de ouriço-do-mar recolhidos na Praia Norte em Viana do Castelo.

Peso (g)					
	Nº ouriços	Média	Máx.	Mín.	CV (%)
Verão	10	87,0	125,3	61,8	23,1
Outono	10	89,8	141,3	68,2	23,5
Inverno	20	72,7	119,0	47,0	22,0
Primavera	20	63,5	80,1	48,1	13,8
Diâmetro equatorial (cm)					
	Nº ouriços	Média	Máx.	Mín.	CV (%)
Verão	10	6,3	7,3	5,5	10,5
Outono	10	6,7	7,9	6,1	7,7
Inverno	20	6,0	7,2	5,6	6,0
Primavera	20	5,7	6,4	5,1	7,4

CV – coeficiente de variação

Verificou-se que o diâmetro equatorial médio das amostras foi superior ao tamanho mínimo de captura de 5 cm, contudo, na Praia de Carreço constatou-se que no verão e na primavera o valor mínimo foi de 4 cm e 4,6 cm respetivamente, não atingindo, portanto, o tamanho mínimo (Tabela 4.2.). Quanto à Praia Norte, constatou-se que o tamanho mínimo de captura foi sempre ultrapassado (Tabela 4.3.).

4.2 Análise microbiológica alimentar – conteúdo edível

O ambiente marinho é habitado por uma numerosa e diversa população bacteriana que, formalmente, compreende dois grupos: a aquática autóctone e a adicionada a partir de diversas fontes (e.g. solo, animais terrestres, efluentes urbanos). Neste quadro, quanto maior for a influência antropogénica maior será a probabilidade de um corpo de água estar povoado por espécies microbianas potencialmente patogénicas para os humanos, e que nos podem (re)infetar (i) através do contacto com a avifauna do meio marinho, (ii) no decurso de atividades de recreio e, sobretudo, (iii) através do consumo de matrizes alimentares oriundas do meio marinho.

Na via de transmissão alimentar assumem particular relevância os géneros alimentícios consumidos crus (sem qualquer tratamento térmico), obtidos a partir de animais que habitem a orla costeira (mais expostos à contaminação) e que se alimentem do sedimento ou por um processo de filtração. Os ouriços e as ostras preenchem cumulativamente estes três riscos e, como tal, devem ser sujeitos a um controlo contínuo e exigente, que permita garantir um nível adequado de segurança e higiene destes animais, e dos seus produtos, em todas as fases da cadeia alimentar.

Neste trabalho essa avaliação realizou-se pela vertente microbiológica e concentrou-se no local da produção primária, abrangendo amostras do meio aquático, do biofilme superficial, do conteúdo edível e dos fluidos fisiológicos. No que concerne ao grupo dos moluscos bivalves vivos e equinodermes,

tunicados e gastrópodes vivos, a trave mestra para a avaliação da segurança sanitária assenta na pesquisa de *Salmonella* spp. e na quantificação de *E. coli* na carne e de líquido intravalvar.

Curiosamente, a avaliação microbiológica da qualidade da água em áreas conquícolas é também realizada através da determinação do NMP de coliformes fecais em 100 mL de polpa dos moluscos e do respetivo líquido intravalvar e, não propriamente, na quantificação direta deste grupo de microrganismos em amostras de água (Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto ⁽¹²¹⁾). Porém, neste diploma o legislador reconhece que esta forma indireta de avaliar a qualidade da água onde vivam moluscos diretamente consumidos pelo homem só deverá vigorar “enquanto não houver legislação específica relativa à proteção dos consumidores de produtos conquícolas.” Esta legislação acabaria por ser adotada no âmbito da grande reforma legal adotada pela União Europeia sob a pressão do *Codex Alimentarius* da Organização Mundial de Saúde, perante as obrigações assumidas em 1995 no âmbito do *Sanitary and Phytosanitary (SPS) Agreement* negociado sob o patrocínio da Organização Mundial de Comércio e após a crise da Encefalopatia Espongiforme Bovina no final do século XX. A pedra base desta revolução doutrinária na avaliação dos riscos associados ao consumo de alimentos viria a ser o Regulamento (CE) nº 178 /2002⁽¹²²⁾, que determinou os princípios e normas gerais da legislação alimentar, criou a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (ASAE) e estabeleceu procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios, dando cumprimento ao compromisso plasmado no Livro Branco da Segurança Alimentar (COM/99/0719), em que a União Europeia exprimia os princípios normativos para assegurar a segurança dos alimentos, preconizando uma abordagem global e integrada ao longo de toda a cadeia alimentar do prado ao prato (1º princípio), criando três níveis de verificação da segurança alimentar, em que competiria aos operadores alimentares assegurar o primeiro nível (2º princípio) e instituindo a necessidade de um sistema de rastreabilidade entre a produção primária e o consumidor (3º princípio). Sob o respaldado do Regulamento (CE) nº 178 /2002, surgiriam três diplomas estruturantes:

- O Regulamento (CE) nº 852/2004 de 29/04 ⁽¹²³⁾ que estabelece as regras gerais destinadas aos operadores das empresas do setor alimentar no que concerne à higiene dos géneros alimentícios;
- Regulamento (CE) nº 853/2004 de 29/04 ⁽⁴³⁾, que estabelece as regras específicas para os operadores das empresas do setor alimentar no que se refere à higiene dos géneros alimentícios de origem animal;
- Regulamento (CE) nº 854/2004 de 29/04 ⁽⁶⁹⁾, que estabelece as regras específicas de organização dos controlos oficiais dos produtos de origem animal;

e um Regulamento (CE) nº 2073 /2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios ⁽¹²⁴⁾.

Conforme anteriormente afirmado, neste diploma a quantificação de *E. coli* é eleita como referencial para a avaliação da segurança sanitária e da qualidade higiênica de todos os moluscos bivalves vivos. Dentro da família Enterobacteriaceae, a *E. coli* é a espécie mais abundante na flora entérica dos animais de sangue quente, contabilizando-se aproximadamente 10^6 a 10^9 UFC (unidades formadoras de colónias)/g de fezes. Se a esta abundância nas fezes de aves e mamíferos, adicionarmos a sua notável capacidade de adaptação a um amplo espectro de habitats (e.g. água, solo, vegetação) e de sobrevivência sob diversas condições ambientais (e.g. temperatura, salinidade, humidade), mesmo quando privada de nutrientes ⁽¹²⁵⁾. Enquanto excelente indicador de contaminação fecal em alimentos e na água, a sua presença indicia a presença de microrganismos patogénicos associados ao biótopo intestinal, tais como *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Shigella dysenteriae*, norovirus, vírus da hepatite A, *Clostridium botulinum*, *Cryptosporidium parvum*, etc., dispensando que se faça a pesquisa direta de cada um destes microrganismos, o que tornaria a avaliação da segurança das ostras e ouriços um processo tecnicamente muito complexo, moroso e economicamente inoportável.

Sendo predominantemente uma bactéria comensal, a *E. coli* é igualmente responsável pela etiologia de toxinfecções alimentares e de diversas infeções extraintestinais (e.g. pneumonia, meningite, septicémia, infeções abdominais, pélvicas e do trato urinário) cuja frequência, patogenicidade e impacto económico são equiparáveis às de outros microrganismos patogénicos. Esta dicotomia na relação com o hospedeiro assenta na posse e expressão de fatores de virulência (mecanismos genéticos) específicos por determinadas estirpes de *E. coli*. Estudos de genómica comparada demonstraram que existem diferenças de milhões de pares de bases entre estas diferentes estirpes, havendo em cada uma um conjunto de genes conservados (*core genome*) e um conjunto, muito diverso e variável, de genes (*extra genetic content*) que lhes conferem grandes diferenças na virulência, resistência aos antibióticos e capacidade de sobrevivência fora do hospedeiro ⁽¹²⁶⁾.

As toxinfecções alimentares causam diversas patovariedades: enteropatogénicas, responsáveis pelo aplanamento das microvilosidades no polo apical dos enterócitos acompanhado por uma diarreia aquosa profusa; enterotoxigénicas, produtoras de enterotoxinas causadoras de um quadro clínico semelhante à cólera; enteroinvasivas, causadoras de disenteria, com sangue e leucócitos nas fezes, muito semelhante à infeção por *Shigella*; enterohemorrágicas, produtoras de verotoxinas e causadoras de um quadro de colite hemorrágica, por vezes acompanhada pelo síndrome hemolítico-urémico; enteroagregativa, associadas a diarreia persistente; difusamente agregativa, possivelmente relacionadas com a doença de Crohn ⁽¹²⁷⁾.

E. coli é igualmente reconhecida pela notável capacidade para aceitar e transmitir genes de resistência, mesmo relativamente a bactérias filogeneticamente afastadas, sendo a espécie referencial na avaliação da pressão seletiva exercida pela administração de antibióticos em determinados biomas, em virtude de permitir uma comparação direta das resistências em diferentes populações (animais e humanas) e a

análise da tendência ao longo do tempo, servindo igualmente como indicador precoce da emergência de resistências noutras bactérias potencialmente patogénicas ⁽⁹¹⁾.

Com base no Regulamento (CE) nº 2073 /2005, constatou-se que todas as amostras de ostras e ouriços recolhidas devem ser consideradas satisfatórias, em virtude de não terem ultrapassado o limite de contaminação por *E. coli* ($> 230 - \leq 4600$ NMP *E. coli*/100 g de ostras criadas em zona classe B) (Fig. 4.1.) e de em nenhuma das amostras se ter detetado *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes* (Tabela 4.4., 4.5. e 4.6.). Acresce sublinhar que, no caso particular das ostras, estes requisitos foram cumpridos antes da depuração e, portanto, antes de se encontrarem prontas a serem colocadas no mercado, conforme estabelecido pelo Regulamento (CE) nº 853/2004. Adicionalmente, os valores obtidos na quantificação de *E. coli* são compatíveis com os exigidos às ostras oriundas de zonas de produção da classe A, atestando que ao nível da produção primária, o produtor de ostras monitorizado neste estudo cumpre as disposições gerais de higiene aplicáveis à produção primária e operações conexas, não sendo necessária a adoção de medidas corretivas a fim de garantir o cumprimento de critérios que definam a aceitabilidade definidos na legislação.

Esta apreciação é particularmente relevante em virtude da zona de produção (Canal de Mira) ter sido classificado como classe B (Despacho nº 19961/2008, de 28 de Julho: ⁽¹²⁸⁾), sendo interdito consumir diretamente ou colocar no mercado ostras oriundas destes corpos de água sem uma passagem prévia por um centro de depuração, ou seja, por um estabelecimento que dispõe de tanques alimentados por água do mar limpa, nos quais os moluscos bivalves vivos são colocados durante o tempo necessário para reduzir a contaminação de forma a torná-los próprios para consumo humano.

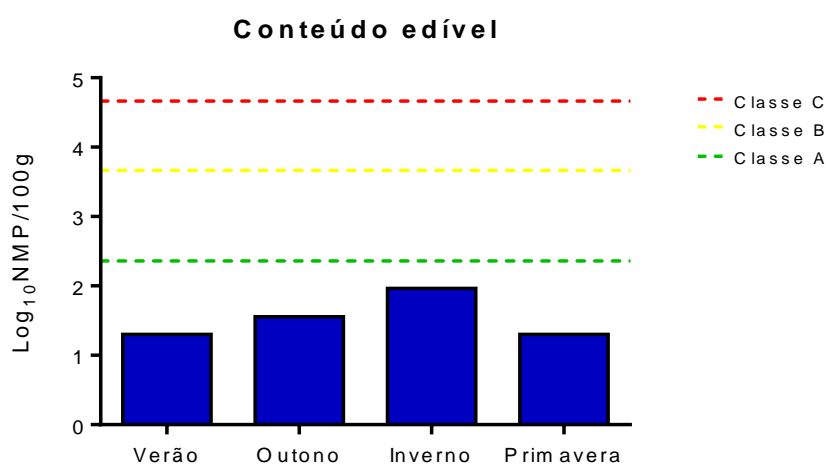


Figura 4.1. Variação sazonal da contaminação por *E. coli* nas amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro. O teor de *E. coli* nas amostras foi determinado pelo método do NMP. As linhas representam os limites da contaminação por *E. coli* que determinam a classificação do estatuto sanitário: classe A ≤ 230 NMP *E. coli*/100 g; classe B $> 230 \leq 4600$ NMP *E. coli*/100 g; classe C $> 4600 \leq 46000$ NMP *E. coli*/100 g.

Os resultados relativos à quantificação de *E. coli* (determinada pelo NMP) no conteúdo edível das ostras avaliadas neste trabalho foram comparados com os resultados dos controlos oficiais publicitados pelo IPMA no âmbito do plano de ação “Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves”. Essa comparação cinge-se (i) a todas as amostras de ostras recolhidas a nível nacional nos meses em que realizámos os nossos ensaios (Fig. 4.2.) e (ii) a todas as amostras de bivalves (independentemente da espécie) recolhidas na Ria de Aveiro (Fig. 4.3.).

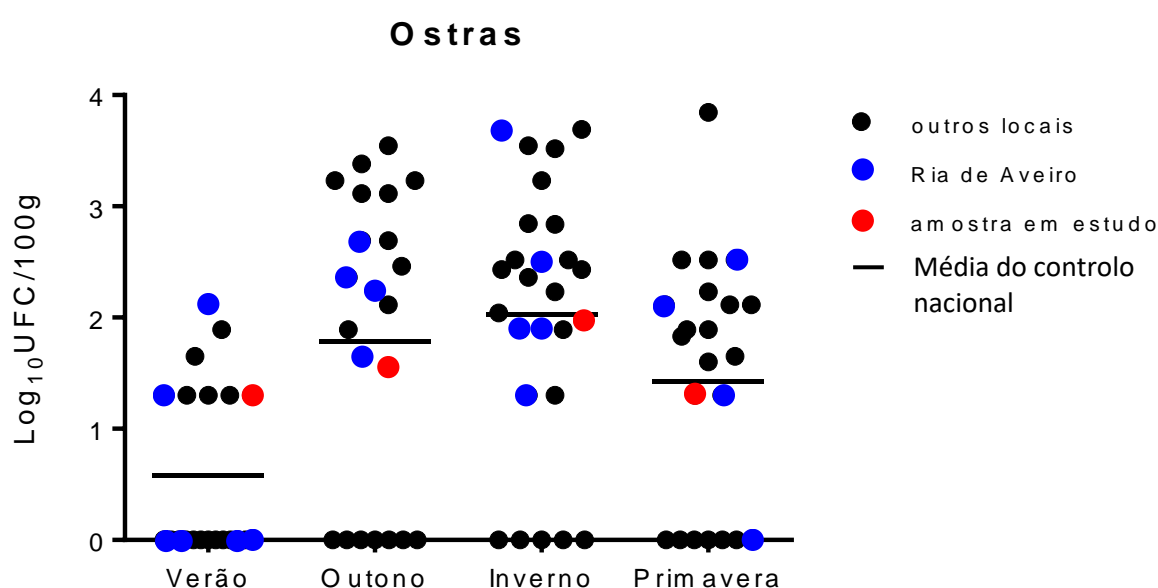


Figura 4.2. Variação sazonal da contaminação por *E. coli* em amostras de ostras recolhidas em diferentes zonas de produção de bivalves em Portugal. O teor de *E. coli* nas amostras foi determinado pelo método do NMP. Estes dados foram recolhidos pelo IPMA no âmbito do plano de ação “Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves”. As linhas pretas representam a média de todas as amostragens. Os resultados aqui apresentados encontram-se disponíveis na página <http://www.ipma.pt/pt/pescas/bivalves/historico/micro/index.jsp> (consultada a 10 de Julho de 2017).

No tocante à comparação de âmbito nacional (Fig. 4.2.), constata-se que a contaminação do conteúdo edível por *E. coli* na amostra do verão, apesar de ter o valor mais baixo comparativamente aos controlos efetuados nas restantes estações do ano, apresenta um valor superior à média nacional. O valor é também superior ao apurado em quatro das seis amostras de ostras recolhidas na Ria de Aveiro no mesmo mês.

Curiosamente, o verão é a época do ano em que se verifica menor contaminação e menor variabilidade entre amostras nas determinações efetuadas no âmbito do “Sistema Nacional de Monitorização de

Moluscos Bivalves”. Nos controlos efetuados durante o mês correspondente à amostragem de inverno, verifica-se precisamente o contrário.

Globalmente, considerando os quatro meses do ano, registam-se grandes diferenças entre as ostras recolhidas (para controlo oficial) em diferentes pontos da Ria de Aveiro, sugerindo que a qualidade da água seja muito heterogénea neste corpo de água. Verifica-se também que as ostras analisadas neste trabalho apresentaram níveis de contaminação inferiores à média do controlo nacional.

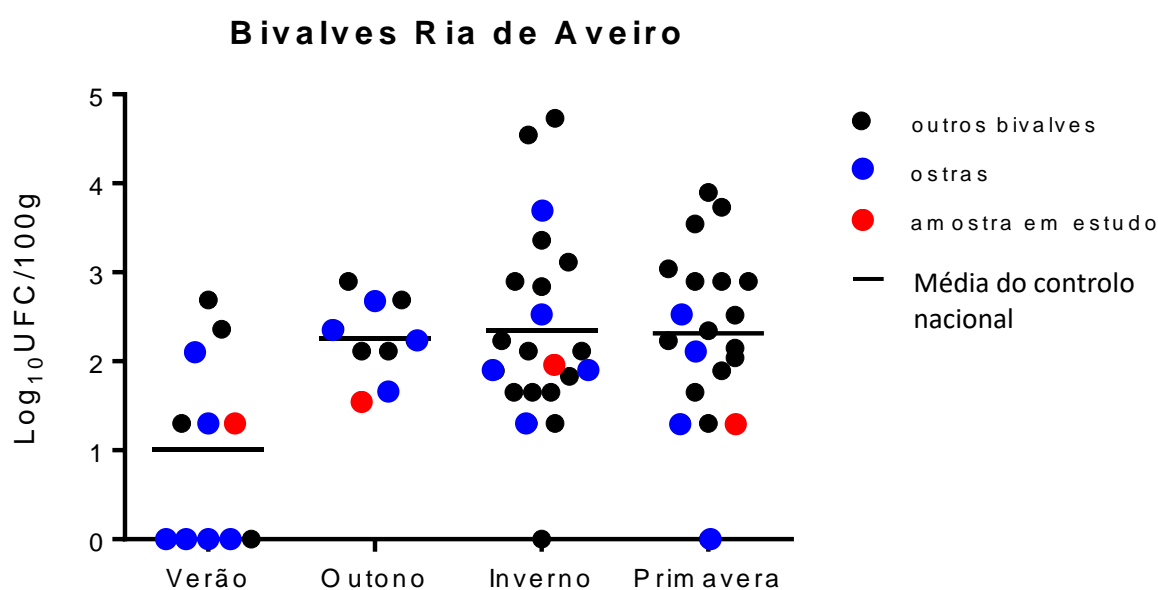


Figura 4.3. Variação sazonal da contaminação por *E. coli* em amostras de bivalves recolhidos na Ria de Aveiro. O teor de *E. coli* nas amostras foi determinado pelo método do NMP. Estes dados foram recolhidos pelo IPMA no âmbito do plano de ação “Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves”. As linhas pretas representam a média de todas as amostragens. Os resultados aqui apresentados encontram-se disponíveis na página <http://www.ipma.pt/pt/pescas/bivalves/historico/micro/index.jsp> (consultada a 10 de Julho de 2017).

Relativamente ao conjunto dos bivalves controlados pela autoridade competente na Ria de Aveiro (Fig. 4.3.), verifica-se um cenário semelhante, com a amostra de verão a ser a única acima da média e a tendência para o controlo relativo ao mês de inverno apresentar a média mais alta e, também, maior variabilidade. Porém, denota-se que as amostras recolhidas no âmbito deste trabalho apresentam resultados mais satisfatórios quando comparadas com os níveis de contaminação do conteúdo edível por *E. coli* nos bivalves controlados pelo IPMA na Ria de Aveiro.

Ainda no que concerne à avaliação do conteúdo edível das ostras, merece destaque a não deteção de estafilococcus coagulase-positiva, nem de *Enterococcus* spp. em qualquer das quatro amostras. Apesar

do limite de deteção do método não ser particularmente elevado (principalmente no caso dos estafilococcus coagulase-positiva), o resultado não deixa de ser surpreendente no caso dos enterococos em virtude de serem comensais muito abundantes na flora entérica do Homem e dos animais (10^5 a 10^8 UFC/g de fezes) ⁽¹²⁹⁾, mas, sobretudo, pelo facto de serem dotados de uma grande capacidade de resistência ao *stress* ambiental, resistindo a uma amplitude extremamente alargada de valores de temperatura, pH e salinidade ^(63,130). Assim, apesar de estar descrita a sua presença habitual na água e em diversas matrizes alimentares (*e.g.* carne, peixe, queijo, vegetais) ⁽⁶²⁾, os resultados obtidos não confirmam esta distribuição ubiquitária.

Mais expectável foi a elevada quantidade de microrganismos totais com crescimento a 30 °C e a 7 °C detetados na amostra de inverno (Fig. 4.4.), em virtude da maior corrente e agitação das águas da ria favorecerem o levantamento dos microrganismos depositados no sedimento e, por outro lado, haver um maior arrastamento de microrganismos do solo em toda a bacia hidrográfica do rio Vouga por força do regime pluviométrico típico desta estação. O facto do pico na contagem de microrganismos totais coincidir, também, com as contaminações mais elevadas no tocante a Enterobacteriaceae, *E. coli* e *Clostridium perfringens* reforçam a última explicação.

Tabela 3.4. – Análise microbiológica alimentar do conteúdo edível das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

Amostragem de Verão				29-07-2016
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	440	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	250	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	28	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	20	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	< 25	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-
Amostragem de Outono				23-11-2016
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	1200	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	600	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	10	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	36	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	20	UFC/g	ISO 7937:2004	Aceitável ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	< 25	UFC/g	-	-
Leveduras	50	UFC/g	-	-
Amostragem de Inverno				24-01-2017
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	1200	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	820	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	130	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	92	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	30	UFC/g	ISO 7937:2004	Aceitável ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	50	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-
Amostragem de Primavera				04-05-2017
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	130	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	110	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	20	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	20	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	100	UFC/g	-	-
Leveduras	50	UFC/g	-	-

^a HPA (Health Protection Agency), Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market.

^b Conforme os critérios microbiológicos definidos na parte A do capítulo II do anexo II do Regulamento (CE) 854/2004.

^c Se considerarmos as ostras como matriz alimentar passível de permitir o crescimento desta espécie.

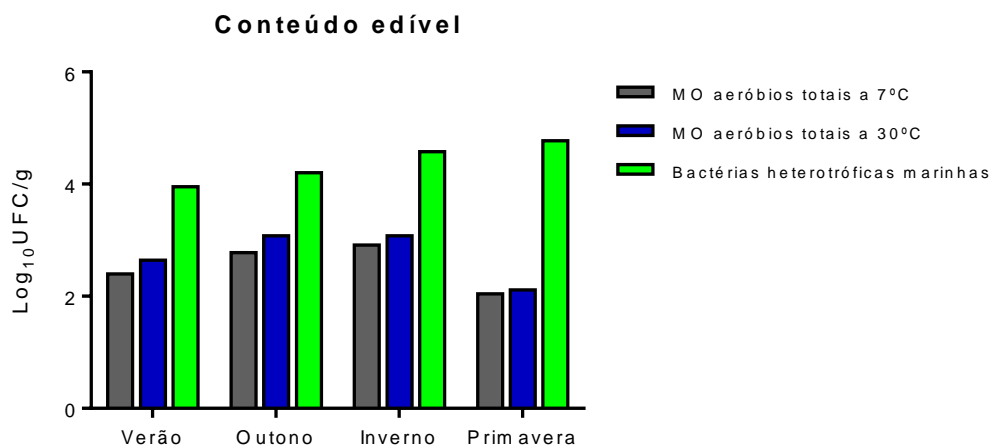


Figura 4.4. Variação sazonal na quantidade de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes na carne e líquido intravalvar (conteúdo edível) das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

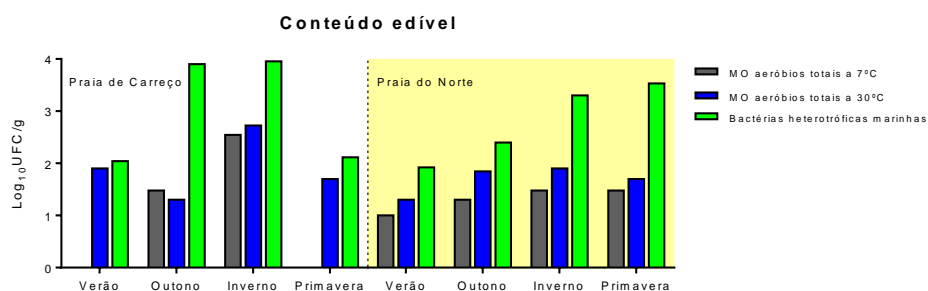


Figura 4.5. Variação sazonal na quantidade de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes nas gónadas (conteúdo edível) das amostras de ouriço-do-mar recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.

Os resultados relativos ao conteúdo edível dos ouriços são, à semelhança do verificado com as ostras, muito satisfatórios, atestando que os locais de recolha seleccionados para este estudo são compatíveis com os requisitos de higiene e segurança. Conforme indicado na Tabela 4.5. e na Tabela 4.6., em nenhuma das amostras de gónadas se detetou qualquer isolado de *E. coli*, *Enterococcus* spp., estafilococcus coagulase-positiva, *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes*. Tendo-se detetado grande parte destes microrganismos no meio aquático em que os ouriços se alimentam (ver secção seguinte: Análise microbiológica do habitat, da superfície e fluidos orgânicos), a boa qualidade microbiológica resultará, em grande parte, do facto da parte edível destes animais corresponder às gónadas, sendo expectável que este órgão se encontre protegido por barreiras físicas e imunitárias eficazes contra a invasão microbiana.

No entanto, é importante sublinhar que, ao contrário das ostras, os ouriços são recolhidos e colocados no mercado sem realizarem qualquer operação de depuração ou lavagem com água do mar limpa com vista a eliminação ou remoção de contaminantes. Nesta perspetiva, ao contrário do aplicável às ostras analisadas, as amostras de ouriços avaliadas neste trabalho devem, impreterivelmente, respeitar os critérios microbiológicos definidos pelo Regulamento (CE) nº 2073 /2005. Sempre que tal não acontecer, os operadores das empresas do setor alimentar devem tomar medidas necessárias para proteger a saúde dos consumidores e que podem passar pela suspensão da recolha, introdução de uma etapa de depuração ou serem submetidos a um processamento, mediante tratamento que elimine o perigo em questão.

Relativamente aos microrganismos totais, os valores quantificados foram muito baixos, sobretudo nos microrganismos aeróbios psicrotróficos, antevendo que se possa estabelecer um período de vida útil (validade) relativamente extenso, desde que conservados a uma temperatura inferior pelo menos a 15°C.

À semelhança do verificado com as ostras, foi também na amostra de inverno que se detetou um maior número de microrganismos aeróbios totais com crescimento a 30 e a 7 °C, acompanhado pela contagem de Enterobacteriaceae mais elevada no conjunto das quatro épocas de amostragem. Este pico de contaminação foi particularmente notório nos ouriços recolhidos na Praia de Carreço em Viana do Castelo (Fig. 4.5.).

Tabela 4.5. – Análise microbiológica alimentar do conteúdo edível das amostras de ouriços-do-mar recolhidas na Praia de Carreço em Viana do Castelo.

Amostragem de Verão				01-09-2016
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	80	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	< 10	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	< 10	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	< 18	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
Estafilococcus coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	25	UFC/g	-	-
Leveduras	25	UFC/g	-	-
Amostragem de Outono				15-11-2016
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	20	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	30	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	< 10	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	< 18	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
Estafilococcus coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	< 25	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-
Amostragem de Inverno				15-02-2017
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	530	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	350	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	250	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	< 18	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
Estafilococcus coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	< 25	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-
Amostragem de Primavera				25-05-2017
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	50	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	< 10	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	20	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	< 18	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
Estafilococcus coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	300	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-

^a HPA (Health Protection Agency), Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market.

^b Conforme os critérios microbiológicos definidos na parte A do capítulo II do anexo II do Regulamento (CE) 854/2004.

^c Se considerarmos as ostras como matriz alimentar passível de permitir o crescimento desta espécie.

Tabela 4.6 – Análise microbiológica alimentar do conteúdo edível das amostras de ouriços-do-mar recolhidas na Praia Norte em Viana do Castelo.

Amostragem de Verão				02-09-2016
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	20	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	10	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	20	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	< 18	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
Estafilococcus coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	25	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-
Amostragem de Outono				16-11-2016
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	70	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	20	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	< 10	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	< 18	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
Estafilococcus coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	< 25	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-
Amostragem de Inverno				15-02-2017
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	80	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	30	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	< 10	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	< 18	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
Estafilococcus coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	< 25	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-
Amostragem de Primavera				26-05-2017
	Resultado	Unidade	Método	Apreciação
MO aeróbios totais a 30°C	50	UFC/g	ISO 4833:2003	Satisfatório ^a
MO aeróbios totais a 7°C	30	UFC/g	ISO 17410:2001	-
Enterobacteriaceae	20	UFC/g	ISO 21528-2:2004	Satisfatório ^a
<i>E. coli</i>	< 18	NMP/100g	ISO 16649-3:2005	Classe A^b
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	UFC/g	-	-
Estafilococcus coagulase-positiva	< 100	UFC/g	ISO 6888-1:1999	Satisfatório/Aceitável ^a
<i>Clostridium perfringens</i>	< 10	UFC/g	ISO 7937:2004	Satisfatório ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ausente	em 25 g	ISO 11290-1:1996	Satisfatório ^{a,c}
<i>Salmonella</i> spp.	ausente	em 25 g	ISO 6579:2002	Satisfatório ^a
Bolores	50	UFC/g	-	-
Leveduras	< 25	UFC/g	-	-

^a HPA (Health Protection Agency), Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market.

^b Conforme os critérios microbiológicos definidos na parte A do capítulo II do anexo II do Regulamento (CE) 854/2004.

^c Se considerarmos as ostras como matriz alimentar passível de permitir o crescimento desta espécie.

4.3. Análise microbiológica do habitat, da superfície e fluidos orgânicos

4.3.1. Ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*)

4.3.1.1 Água nas zonas de produção

Designam-se por “águas conquícolas” as águas que suportam a vida e o crescimento de moluscos (bivalves e gastrópodes) equinodermes, tunicados e crustáceos. O dever institucional de proteger e melhorar a qualidade das águas encontra-se plasmado na Lei n.º 58/2005 de 29 de Dezembro ⁽¹³¹⁾, conhecida como “lei da água” que transpõe para a ordem jurídica nacional a Diretiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro ⁽¹³²⁾, e estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas e para a salvaguardar da sua qualidade.

A obrigatoriedade de monitorização da qualidade das águas para suporte da vida aquícola encontra-se legislada no Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto ⁽¹²¹⁾, que estabelece as normas, os objetivos e os critérios de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. O referido diploma é bastante abrangente, definindo igualmente os requisitos a observar nas águas balneares, águas de rega e na utilização das águas para consumo humano, assim como as normas de descarga das águas residuais na água e no solo. No seu Artigo 41.º, o Decreto-Lei nº 236/98 define competências a diversas entidades relativa e especificamente a cada um daqueles domínios, no que respeita ao licenciamento, inspeção, fiscalização, vigilância e classificação e inventário das águas.

As normas de qualidade aplicáveis às águas conquícolas encontram-se fixadas no anexo XIII do citado diploma (Anexo III). A maior parte dos parâmetros é de natureza físico-química, tendo sido adotado apenas um parâmetro microbiológico que, curiosamente, não incide na avaliação direta da água, mas sim na determinação do NMP de coliformes fecais em 100 mL de polpa dos moluscos e do respetivo líquido intravalvar. Desta forma, é a qualidade microbiológica dos produtos criados (moluscos) o indicador da qualidade do meio em que estes se desenvolvem. Neste âmbito, considerando a *E. coli* como equivalente aos coliformes fecais, podemos considerar que os três corpos de água avaliados durante este trabalho cumprem os requisitos legais, que impõem que 75 % das amostras recolhidas trimestralmente durante um período de 12 meses tenham um valor igual ou inferior a 300 coliformes fecais para que as águas conquícolas sejam consideradas em conformidade com as normas de qualidade legisladas.

Neste trabalho, porém, procurou-se também avaliar diretamente a qualidade da água no meio de produção, recolhendo amostras no mesmo dia em que se recolheram as ostras, de forma a permitir

estudar as variações sazonais e, ao mesmo tempo, cumprir o estipulado na legislação, que prevê igualmente a colheita de amostras num mesmo local durante um período de 12 meses (Anexo III).

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.6. e na Tabela 4.7. e podem ser qualificados como surpreendentes pela positiva. Apesar de não ter sido objetivo deste estudo fazer o levantamento de eventuais pontos de descarga de poluentes próximos aos locais de produção/amostragem, são bem conhecidos os problemas de poluição orgânica no Canal de Mira da Ria de Aveiro ⁽¹³³⁾. Neste contexto, seria expectável que os valores de contaminação por *E. coli* fossem mais elevados e muito superiores aos verificados nas águas costeiras abertas em que se colheram os ouriços. É sabido que o ambiente marinho possui uma notável capacidade de autodepuração, permitindo-lhe neutralizar as alterações produzidas pelas contínuas descargas de efluentes e restabelecer o seu equilíbrio.

No caso particular do Canal de Mira, a um quadro potencial de poluição antropogénica, adiciona-se um regime limitado de renovação da água, em virtude da Ria de Aveiro se encontrar na fronteira entre as “águas de transição” (*i.e.* águas superficiais na proximidade da foz dos rios, parcialmente salgadas em resultado da proximidade de águas costeiras, mas que também podem ser influenciadas por cursos de água doce) e as “águas costeiras” (*i.e.* águas superficiais situadas entre terra e uma linha cujos pontos se encontram a uma distância de 1 milha náutica, na direção do mar, a partir do ponto mais próximo da linha de base a partir da qual é medida a delimitação das águas territoriais, estendendo-se, quando aplicável, até ao limite exterior das águas de transição).

Em trabalhos futuros seria interessante recolher amostras noutros pontos da Ria de Aveiro e estudar a forma como as variações de salinidade e a eventual presença de vírus fágicos podem contribuir para os resultados obtidos.

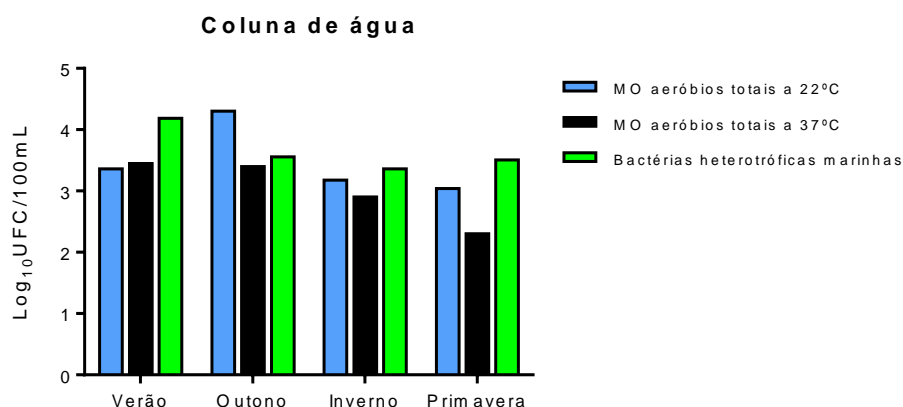


Figura 4.6. Variação sazonal da quantidade de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas nas amostras de água recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

Relativamente à variação no número de microrganismos totais com crescimento em PCA, esta parece nitidamente ligada ao regime pluviométrico típico e às consequentes alterações na salinidade. Assim, nas primeiras chuvas de outono deteta-se um acréscimo significativo no número de microrganismos aeróbios com crescimento a 22 °C, muito provavelmente em consequência do seu arrastamento a partir do solo. As primeiras chuvas de outono provocam sempre uma erosão mais intensa em virtude do solo ter perdido grande parte da sua cobertura herbácea durante o verão. Com os incêndios, e a perda total da cobertura vegetal, estes fenómenos de arrasto são ainda mais intensos.

Por sua vez, a maior salinidade da água da ria no verão, devido à redução do caudal do rio Vouga e ao aumento da evaporação, justifica o incremento no número de bactérias heterotróficas marinhas comparativamente às restantes estações, particularmente em relação ao inverno em que ocorre precisamente o fenómeno oposto, *i.e.*, uma redução na salinidade.

Importa esclarecer que em algumas amostras de água e em certas amostras de biofilme e líquido intravalvar, o número de “microrganismos totais” é inferior ao número de bactérias heterotróficas marinhas. Este aparente paradoxo é explicável pela natureza particular das amostras e da microflora mais ou menos adaptada à salinidade do ambiente marinho. Ou seja, para além das diferenças ligeiras nas condições de incubação: 30 °C ou 22 °C durante 72 horas no caso dos microrganismos totais e 21 °C durante 48 horas para as bactérias heterotróficas marinhas, existe uma diferença substancial na composição química dos meios que, naturalmente, lhes confere uma seletividade diferencial. Assim, em amostras em que haja uma forte presença de bactérias halófilas, é necessário manter presente que grande parte destas espécies ou não crescem em PCA ou se multiplicam a uma velocidade insuficiente para formarem colónias contáveis ao fim de 72 horas de incubação, pelo que a denominação “microrganismos totais” deverá ser interpretada com a devida prudência.

Tabela 4.7. Monitorização microbiológica das amostras de ostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

Coluna de água (UFC/100 mL)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 22°C	2,3X10 ³	2,0X10 ⁴	1,5X10 ³	1,1X10 ³
MO aeróbios totais a 37°C	2,8X10 ³	2,5X10 ³	8,0X10 ²	2,0X10 ²
Bactérias heterotróficas marinhas	1,5X10 ⁴	3,6X10 ³	2,3X10 ³	3,2X10 ³
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	3,8X10 ⁰	1,8X10 ¹	6,0X10 ⁰	1,0X10 ¹
<i>Enterococcus</i> spp.	3,0X10 ⁰	9,2X10 ¹	2,0X10 ⁰	< 1
<i>Salmonella</i> spp.	Presente em 1 L	Ausente em 1 L	Presente em 1 L	Ausente em 1 L
Biofilme superficial (UFC/g)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	3,6X10 ⁴	2,1X10 ⁵	2,6X10 ³	4,5X10 ³
Bactérias heterotróficas marinhas	1,5X10 ⁶	2,7X10 ³	4,9X10 ⁴	5,1X10 ⁵
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	< 1	2,6X10 ⁰	9,8X10 ¹	5,5X10 ¹
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	< 0,1	< 0,1	1,1X10 ⁰	< 0,1
<i>Enterococcus</i> spp.	9,2X10 ⁻¹	< 0,1	1,9X10 ⁰	7,3X10 ⁻¹
Líquido intravalvar (UFC/mL)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	2,4X10 ⁴	2,0X10 ⁴	3,8X10 ²	6,0X10 ²
Bactérias heterotróficas marinhas	3,1X10 ⁵	2,3X10 ²	5,1X10 ³	4,6X10 ⁴
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	1,3X10 ³	< 10	< 10	< 10
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	6,7X10 ²	< 1	< 1	< 1
<i>Enterococcus</i> spp.	< 1	< 1	5,0X10 ⁰	< 1
Hemolinfa (UFC/mL)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	2,0X10 ³	7,6X10 ³	4,3X10 ³	1,4X10 ²
Bactérias heterotróficas marinhas	3,3X10 ⁵	1,6X10 ¹	2,0X10 ²	3,5X10 ⁵
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Enterococcus</i> spp.	< 1	< 1	< 1	< 1
Conteúdo edível (UFC/g)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	4,4X10 ²	1,2X10 ³	1,2X10 ³	1,3X10 ²
MO aeróbios totais a 7°C	2,5X10 ²	6,0X10 ²	8,2X10 ²	1,1X10 ²
Bactérias heterotróficas marinhas	9,0X10 ³	1,6X10 ⁴	3,8X10 ⁴	5,9X10 ⁴
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	6,7X10 ³	1,0X10 ²	1,0X10 ²	2,0X10 ²
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	< 10	1,0X10 ²	1,0X10 ¹	< 10
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g

4.3.1.2 Biofilme superficial

A natureza do biofilme formado na superfície da concha das ostras resultará da confluência de diversos fatores, entre os quais figuram o número e a natureza dos microrganismos presentes na água, a abundância de partículas em suspensão, a velocidade das correntes de água na superfície da concha, a própria natureza da concha (irregularidade, carga elétrica superficial, etc.) e a exclusão competitiva desencadeada pelas populações bacterianas que previamente colonizaram a concha. No que concerne aos microrganismos totais, não havendo inteira correspondência entre as unidades, os resultados

demonstram haver um certo grau de paralelismo com as contagens efetuadas na coluna de água. Nas amostras de inverno e da primavera existe correspondência, enquanto nas amostras de verão e de outono existe uma diferença de aproximadamente um logaritmo (Fig. 4.7. e Tabela 4.7.). Relativamente às bactérias heterotróficas marinhas, verificou-se uma quase equivalência na amostra de outono (provavelmente devido à entrada na ria de grandes volumes de água doce “carregada” de microflora telúrica, enquanto no verão a diferença superou os dois logaritmos, possivelmente devido à salinidade mais elevada promover a sua diferença diferencial).

Os microrganismos de origem fecal (*E. coli* e enterococos) não parecem concentrar-se de uma forma diferenciada no biofilme superficial das conchas, sendo este um facto relevante em termos de gestão do risco pós-colheita, *i.e.*, contaminação das mãos dos manipuladores, das superfícies dos contentores e, acima de tudo, da água dos tanques de depuração, mesmo tendo presente que as ostras são pré-lavadas antes de serem colocadas nestes tanques.

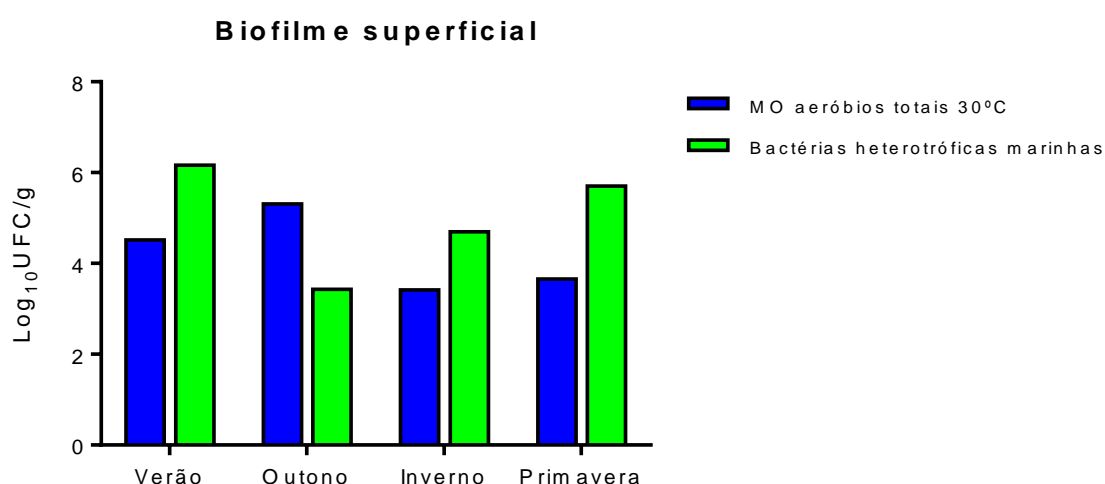


Figura 4.7. Variação sazonal do número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes no biofilme superficial das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

4.3.1.3. Líquido intravalvar

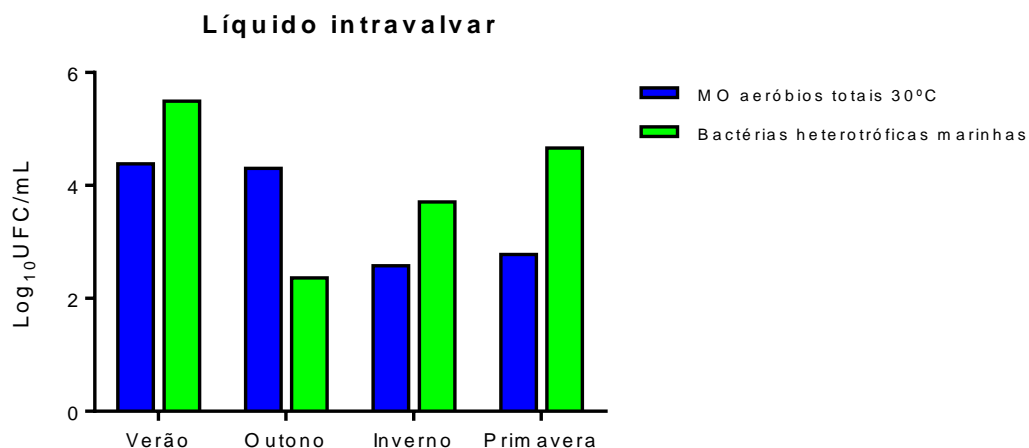


Figura 4.8. Variação sazonal no número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes no líquido intravalvar das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

Ao contrário do esperado, registaram-se diferenças marcantes, mas sem um padrão definido, entre o número de microrganismos detetados no líquido intravalvar e o número apurado na coluna de água em que as ostras se alimentam, registando-se uma maior concentração de microrganismos no líquido intravalvar (Fig. 4.8 e Tabela 4.7.), comparativamente aos valores apurados na água: o número de microrganismos totais aumentou 12 vezes e o número de bactérias heterotróficas marinhas aumentou 28 vezes. Porém, tal como o ocorrido no biofilme superficial, esta concentração não foi extensível às bactérias de origem fecal. Antes pelo contrário, verificou-se uma ligeira redução que, em qualquer das circunstâncias, deverá ser interpretada com precaução, em virtude de estarmos a comparar medições com sensibilidades muito diferentes: na água a pesquisa é efetuada em 100 mL, enquanto no líquido intravalvar a pesquisa faz-se em apenas 1 g de amostra.

À semelhança do verificado na comparação entre a água e o biofilme superficial, no outono houve um decréscimo no número de bactérias heterotróficas marinhas (100 vezes inferior ao número de microrganismos totais com crescimento em PCA), enquanto no verão se registou o valor mais elevado deste grupo de microrganismos. Na primavera e no inverno o número de bactérias com crescimento em agar marinho foi sempre superior ao número de microrganismos com crescimento em PCA.

4.3.1.4. Hemolinfa

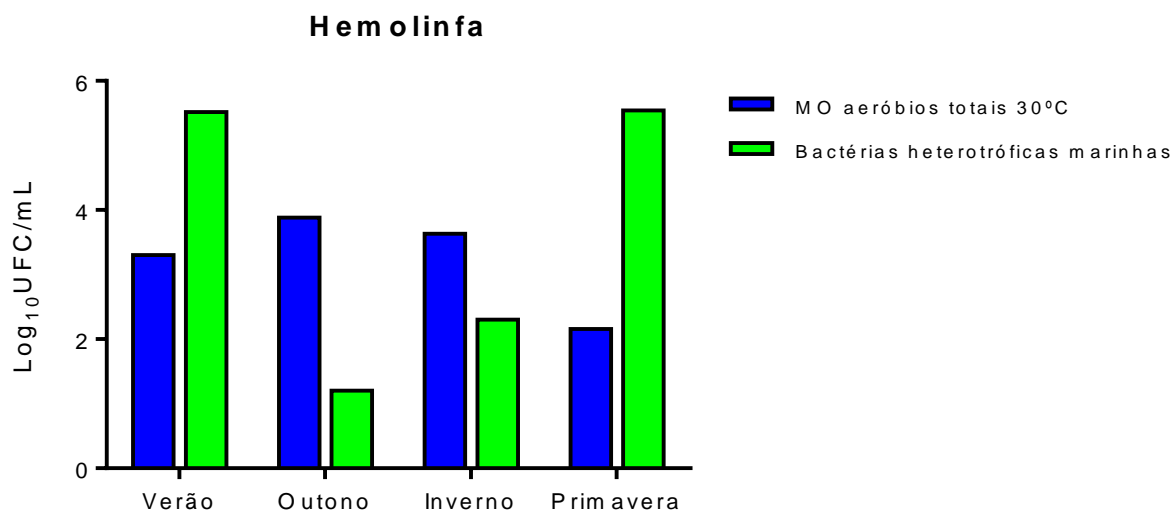


Figura 4.9. Variação sazonal no número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes na hemolinfa das amostras de ostra-do-Pacífico recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

Detetou-se uma grande flutuação na quantidade de microrganismos cultiváveis a partir das amostras de hemolinfa, mais particularmente no tocante às bactérias heterotróficas marinhas: muito abundantes nas amostras de verão e de primavera (Fig. 4.9. e Tabela 4.7.).

Os bivalves filtram e retêm uma imensa quantidade de microrganismos presentes na água das zonas de produção ^(96,134). Uma ostra adulta filtra em média 10 litros de água/hora/g de peso seco ⁽¹³⁵⁾, retendo bactérias, fitoplâncton, pequenas larvas de invertebrados e detritos em suspenso na água. As ostras selecionam as partículas que ingerem em função do seu tamanho, demonstrando particular preferência por partículas com um diâmetro variável entre 5 e 7 µm. Estas são recolhidas ao nível das brânquias que, assim, parecem atuar como uma peneira ⁽¹³⁶⁾. O bolo ingerido vai-se depositando no estômago (revestido por células ciliadas e muco) e, posteriormente, é encaminhada para a glândula digestiva, onde sofrem digestão intracelular, passando a fração não absorvida para o intestino. Considerando que uma ostra pode facilmente filtrar 60 litros de água por dia e considerando o número médio de microrganismos totais (com crescimento a 22 °C) detetado nas amostras de água recolhidas nas zonas de produção, poderemos assumir que cada ostra “admite” cerca de 3 735 000 bactérias viáveis por dia. Para além de servirem de suporte nutricional, é possível que estas bactérias possam ter impactos positivos ou negativos na vitalidade das ostras, consoante venham a estabelecer uma relação simbiótica ou parasitária (incluindo neste campo as que possam ser patogénicas), respetivamente. Ainda assim,

estes invertebrados aparentemente simples conseguem sobreviver e florescer num ambiente caracterizado por uma elevada e diversa carga bacteriana, dependendo (i) da exclusão competitiva exercida pelas comunidades bacterianas que previamente conseguiram alcançar e perpetuar-se nos líquidos orgânicos ou colonizar os tecidos das ostras ⁽¹³⁵⁾ e dependendo (ii) da eficácia do seu sistema imunológico para evitar uma potencial invasão sistémica por bactérias dotadas dessa capacidade ⁽¹³⁷⁾.

Sabe-se que os invertebrados possuem mecanismos primários de imunidade passiva, nomeadamente barreiras físico-químicas, tais como esqueletos externos, conchas, cutícula e muco. Este último, para além da viscosidade e de ser pobre em fontes nutricionais para as bactérias, é rico em peptídeos antimicrobianos tais como defensinas, peptídeos ricos em prolina e proteínas com atividade bactericida/permeabilização da membrana das bactérias, bem como de potentes reações dependentes de oxigénio ⁽¹³⁸⁾.

A segunda linha de defesa baseia-se em componentes da hemolinfa, nomeadamente hemócitos circulantes e peptídios antimicrobianos que exibem mecanismos de ação bastante diversos que vão desde a inibição de vias metabólicas à lise das bactérias. Na hemolinfa das ostras também é possível encontrar proteínas homólogas da metaloenzima extracelular superóxido dismutase. Alguns membros desta família de proteínas podem funcionar como opsinas e ligarem-se ao lipopolissacarídeo de bactérias patogénicas como, por exemplo, *Vibrio* spp. Nas brânquias, no manto e no tubo digestivo da *C. gigas* também já foi detetada atividade da lisozima ⁽¹³⁹⁾.

Assim, apesar dos bivalves não possuírem um sistema imunitário adaptativo, estes animais desenvolveram mecanismos de eliminação seletiva resultantes da ação conjugada de mecanismos de defesa humoral e celular. De acordo com Prieur *et al.* ⁽¹⁴⁰⁾, Rinkevich e Muller ⁽¹⁴¹⁾, a eliminação de determinadas espécies bacterianas faz-se principalmente por fagocitose, através da ação de granulócitos, hialinócitos e agranulócitos capazes de reconhecerem, adsorverem, internalizarem e inativarem microrganismos não simbióticos. Este processo de depuração seletiva foi anteriormente demonstrado em bivalves de água doce da espécie *Anodonta cygnea* relativamente a enterococos e *E. coli* ^(137,142).

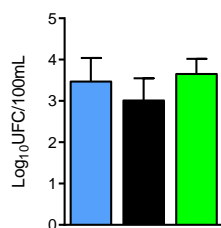
Neste estudo, em nenhuma das quatro amostras de hemolinfa se detetou qualquer destas bactérias fecais, apesar de as mesmas terem sido detetadas na coluna de água e líquido intravalvar, sugerindo que também nestes bivalves existam mecanismos específicos de barreira e/ou reconhecimento e destruição de enterococos e *E. coli*. Esta é, porém, uma apreciação meramente factual, sendo necessário reconhecer que existe ainda um conhecimento muito limitado sobre a natureza da relação entre os bivalves e a flora microbiana que os rodeia.

Na verdade, determinadas espécies bacterianas parecem bem-adaptadas (i.e., são capazes de obter na hemolinfa os nutrientes que necessitam e, ao mesmo tempo, resistir aos mecanismos de defesa deste fluido) e/ou bem-toleradas (endossimbióticas). No extremo oposto, existem grupos em que a presença se afigura meramente transitória, seja por inadaptação ao meio, seja pela incapacidade em competir com a população bacteriana “natural”, seja ainda por incapacidade de resistência aos mecanismos de defesa ⁽¹³⁵⁾.

No futuro, mediante o recurso a outros meios de cultura mais específicos e, sobretudo, a técnicas de biologia molecular (e.g. pirosequenciação), haverá que realizar estudos mais direcionados para a identificação dos géneros e espécies bacterianas presentes na hemolinfa e em que medida estes diferem da microbiota da coluna de água.

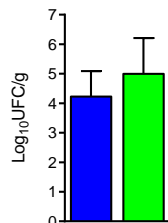
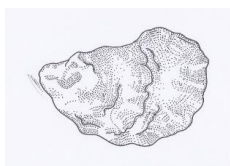
Além do interesse em descortinar os mecanismos biológicos que permitem às ostras tolerar ou eliminar seletivamente diferentes espécies bacterianas, e assim apresentarem uma flora bacteriana que não reflete inteiramente as espécies detetadas nas águas em que se alimentam ⁽¹³⁵⁾, importa encarar esta atividade depuradora segundo outras perspetivas. Numa abordagem orientada para a saúde ambiental, a competência destes bivalves para filtrarem e eliminarem bactérias fecais tem o maior interesse, principalmente pelo contributo que possa trazer para a redução da presença destes microrganismos nos ecossistemas aquáticos (biorremediação), diminuindo a probabilidade de transmissão ao homem e outras populações animais. Numa perspetiva mais ecológica e zootécnica, importa também avaliar os impactos no crescimento, saúde e viabilidade das ostras decorrentes e o esforço metabólico empreendido na defesa e na eliminação seletiva das bactérias consideradas “indesejáveis” ⁽⁹¹⁾.

Coluna de água



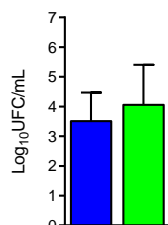
<i>E. coli</i>					9,5	UFC/100 mL
<i>Enterococcus</i> spp.					32,3	UFC/100 mL
<i>Salmonella</i> spp.					presente	em 1 L

Biofilme superficial



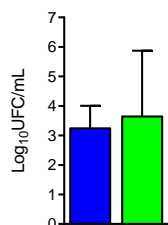
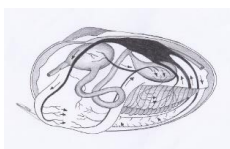
<i>E. coli</i>					1,1	UFC/g
MC MacConkey					52	UFC/g
<i>Enterococcus</i> spp.					1,2	UFC/g

Líquido intravalvar



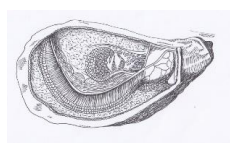
<i>E. coli</i>					670	UFC/mL
MC MacConkey					1300	UFC/mL
<i>Enterococcus</i> spp.					5	UFC/mL

Hemolinfa

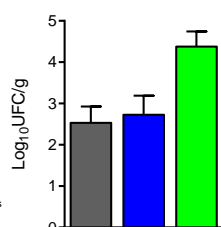


<i>E. coli</i>					< 1	UFC/mL
MC MacConkey					< 10	UFC/mL
<i>Enterococcus</i> spp.					< 1	UFC/mL

Conteúdo edível



MO aeróbios totais a 7°C
 MO aeróbios totais a 22°C
 MO aeróbios totais a 30°C
 MO aeróbios totais a 37°C
 Bactérias heterotróficas marinhas



<i>E. coli</i>					55	UFC/g
					42	NMP/100g
MC VRGB					47	UFC/g
MC MacConkey					1775	UFC/g
<i>C. perfringens</i>					25	UFC/g
Bolores					75	UFC/g
Leveduras					50	UFC/g
<i>Staph. coagulase +</i>					< 100	UFC/g
<i>Enterococcus</i> spp.					< 10	UFC/g
<i>Salmonella</i> spp.					ausente	em 25 g
<i>L. monocytogenes</i>					ausente	em 25 g

Figura 4.10. Síntese dos resultados das análises realizadas a *C. gigas*. Os resultados apresentados nos gráficos correspondem à média ± desvio padrão das quatro amostragens sazonais realizadas. Os resultados apresentados nas tabelas resumem os resultados obtidos em cada uma das amostragens sazonais. A cor verde indica a não detecção do microorganismo na amostra e a cor vermelha a sua presença. Os valores apresentados na tabela correspondem à média das amostras positivas para o microorganismo correspondente.

4.3.2. Ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*)

4.3.2.1 Água do mar

O contraste entre a natureza costeira (aberta) das águas do habitat dos ouriços e as águas de transição (semifechadas) do Canal de Mira justifica a maior abundância de bactérias com crescimento em agar marinho. Por sua vez, a forte influência antropogénica em torno da Ria de Aveiro, conjuntamente com um menor grau de renovação das águas, faria pressupor uma maior presença de bactérias fecais nestas águas. Porém, tal não se veio a verificar: nas amostras de água recolhidas no Canal de Mira (Tabela 4.7.) as contagens médias do principal indicador de contaminação fecal (*E. coli*) foram 1,7 e 11 vezes inferiores às verificadas na Praia de Carreço e na Praia Norte, respetivamente (Tabela 4.8. e Tabela 4.9.). A mesma tendência manteve-se nas contagens de enterococos na Praia Norte (quase 5 vezes superior ao Canal de Mira), havendo uma inversão no caso da Praia de Carreço. A proximidade à foz de cursos de água muito poluídos ou a pontos de descarga de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) com funcionamento deficiente ou sem tratamento terciário (não investigados no âmbito deste trabalho) podem explicar a degradação da qualidade da água (Fig. 4.11.).

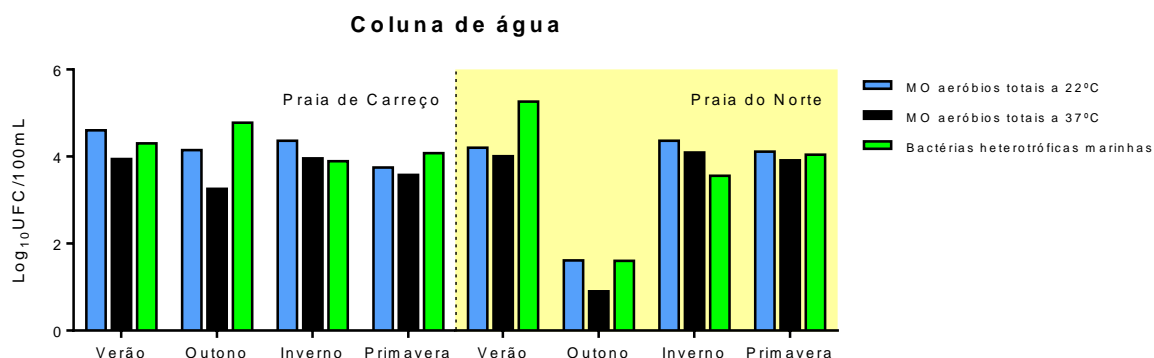


Figura 4.11. Variação sazonal da quantidade de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas nas amostras de água recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.

Tabela 4.8. Monitorização microbiológica das amostras recolhidas na Praia de Carreço em Viana do Castelo.

Coluna de água (UFC/100 mL)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 22°C	4,0X10 ⁴	1,4X10 ⁴	2,3X10 ⁴	5,6X10 ³
MO aeróbios totais a 37°C	8,8X10 ³	1,8X10 ³	9,1X10 ³	3,8X10 ³
Bactérias heterotróficas marinhas	2,0X10 ⁴	6,0X10 ⁴	7,8X10 ³	1,2X10 ⁴
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	2,8X10 ¹	8,0X10 ⁰	1,3X10 ¹	1,4X10 ¹
<i>Enterococcus</i> spp.	4,5X10 ⁰	3,0X10 ⁰	7,3X10 ⁰	9,0X10 ⁰
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 1 L	Ausente em 1 L	Ausente em 1 L	Ausente em 1 L
Biofilme superficial (UFC/g)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	2,7X10 ²	5,4X10 ¹	1,4X10 ²	5,5X10 ²
Bactérias heterotróficas marinhas	7,4X10 ⁰	9,3X10 ⁰	2,0X10 ²	3,6X10 ²
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	1,3X10 ⁻¹	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>Enterococcus</i> spp.	< 0,1	< 0,1	3,3X10 ⁻¹	< 0,1
Líquido celómico (UFC/mL)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	3,0X10 ⁰	< 1	< 1	1,0X10 ⁰
Bactérias heterotróficas marinhas	1,5X10 ¹	< 1	9,0X10 ⁰	2,0X10 ⁰
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Enterococcus</i> spp.	< 1	< 1	< 1	< 1
Conteúdo edível (UFC/g)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	8,0X10 ¹	2,0X10 ¹	5,3X10 ²	5,0X10 ¹
MO aeróbios totais a 7°C	< 10	3,0X10 ¹	3,5X10 ²	< 10
Bactérias heterotróficas marinhas	1,1X10 ²	8,0X10 ³	9,0X10 ³	1,3X10 ²
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	< 100	< 100	< 100	1,0X10 ²
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g

Tabela 4.9. Monitorização microbiológica das amostras recolhidas na Praia do Norte em Viana do Castelo.

Coluna de água (UFC/100 mL)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 22°C	1,6X10 ⁴	4,1X10 ¹	1,4X10 ⁴	1,3X10 ⁴
MO aeróbios totais a 37°C	1,0X10 ⁴	8,0X10 ⁰	1,2X10 ⁴	8,2X10 ³
Bactérias heterotróficas marinhas	1,8X10 ⁵	4,0X10 ¹	3,6X10 ³	1,1X10 ⁴
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	1,8X10 ¹	1,0X10 ⁰	1,0X10 ⁰	4,0X10 ²
<i>Enterococcus</i> spp.	2,9X10 ¹	1,0X10 ⁰	3,3X10 ⁻¹	6,0X10 ²
<i>Salmonella</i> spp.	Presente em 1 L	Ausente em 1 L	Ausente em 1 L	Ausente em 1 L
Biofilme superficial (UFC/g)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	4,1X10 ¹	1,8X10 ¹	2,0X10 ¹	7,4X10 ⁰
Bactérias heterotróficas marinhas	1,5X10 ¹	3,1X10 ⁰	6,9X10 ⁰	1,6X10 ²
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	< 1	< 1	< 1	< 2
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
<i>Enterococcus</i> spp.	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,2
Líquido celómico (UFC/mL)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	1,0X10 ¹	9,9X10 ¹	2,8X10 ²	2,0X10 ⁰
Bactérias heterotróficas marinhas	3,8X10 ¹	1,3X10 ¹	1,0X10 ⁰	1,0X10 ⁰
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Enterococcus</i> spp.	< 1	< 1	< 1	< 1
Conteúdo edível (UFC/g)				
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
MO aeróbios totais a 30°C	2,0X10 ¹	7,0X10 ¹	8,0X10 ¹	5,0X10 ¹
MO aeróbios totais a 7°C	1,0X10 ¹	2,0X10 ¹	3,0X10 ¹	3,0X10 ¹
Bactérias heterotróficas marinhas	8,3X10 ³	2,5X10 ²	2,0X10 ³	3,4X10 ³
Enterobacteriaceae (<i>MacConkey</i>)	< 100	< 100	1,0X10 ²	4,0X10 ²
<i>E. coli</i> β-glucuronidase positiva	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Enterococcus</i> spp.	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g	Ausente em 25 g

4.3.2.2. Biofilme superficial

Existem diferenças no número de microrganismos aeróbios mesófilos detetado na superfície dos ouriços recolhidos nas diferentes praias (Fig. 4.12.), denotando-se uma correspondência global com os valores apurados na coluna de água (Fig. 4.11.), embora esta relação seja mais difícil de sustentar quando se comparam individualmente as amostras, i.e. considerando a data e o local. Na apreciação global das contagens é também possível constatar que na Praia Norte existe uma maior diferença entre o número de microrganismos totais presentes na água e o número de microrganismo encontrado na superfície dos ouriços.

Comparativamente às ostras, verifica-se que a superfície dos ouriços é muito menos propensa à colonização microbiana: totais, bactérias heterotróficas marinhas e Enterobacteriaceae. O facto dos últimos se encontrarem muito expostos a fortes correntes de água produzidas pela ondulação pode ajudar a explicar, pelo menos parcialmente, estas diferenças.

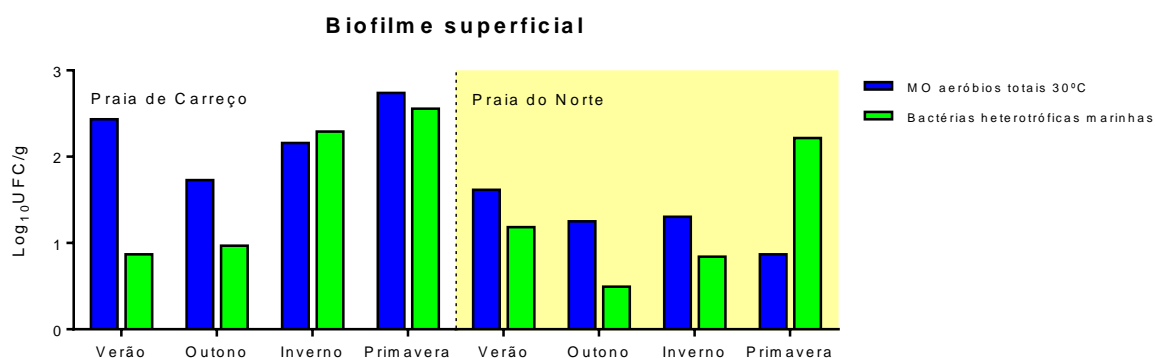


Figura 4.12. Variação sazonal do número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes no biofilme superficial das amostras de ouriço-do-mar recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.

4.3.2.3 Líquido celómico

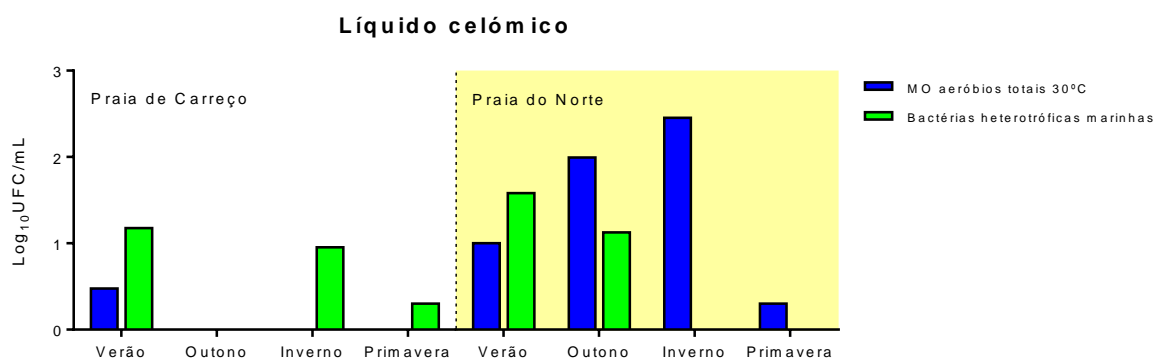
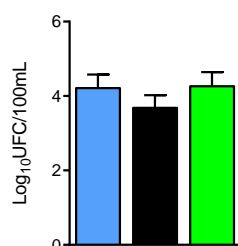


Figura 4.13. Variação sazonal do número de microrganismos aeróbios totais e de bactérias heterotróficas marinhas presentes no líquido celómico das amostras de ouriço-do-mar recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.

Comparativamente à hemolinfa das ostras, verifica-se uma muito menor presença de bactérias no líquido celómico dos ouriços (Tabela 4.7., 4.8 e 4.9); cerca de 100 vezes menos. Este é um dado interessante e com repercussões na segurança alimentar em virtude de não ser possível extrair as gónadas para consumo sem recolher igualmente o líquido celómico que as envolve. Sendo admissível que o tubo digestivo destes equinodermes seja muito pouco permeável aos microrganismos, a existência de vários fatores solúveis como lisinas, aglutininas, citocinas, lectinas, profenoloxidase, moléculas homólogas de fatores do sistema do complemento e peptídeos antimicrobianos com propriedades líticas ou de opsonização, que lhes conferem defesas contra agentes patogénicos.

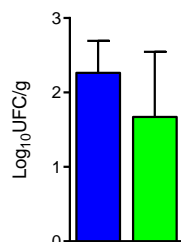
Na análise conjunta dos diferentes componentes avaliados, verifica-se que os ouriços da Praia de Carreço, apesar de viverem num ambiente aquático com maior carga microbiana e, conforme exposto anteriormente, terem um biofilme superficial mais abundante, têm menos microrganismos mesófilos e menos bactérias heterotróficas marinhas no seu líquido celómico (Fig. 4.13.).

Coluna de água



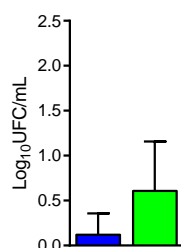
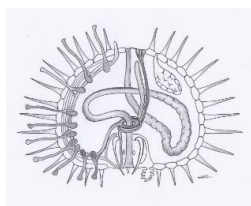
<i>E. coli</i>					15,8	UFC/100 mL
<i>Enterococcus</i> spp.					6,0	UFC/100 mL
<i>Salmonella</i> spp.					ausente	em 1 L

Biofilme superficial



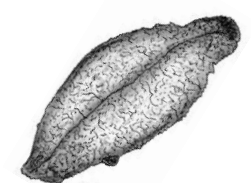
<i>E. coli</i>					0,1	UFC/g
MC MacConkey					< 1	UFC/g
<i>Enterococcus</i> spp.					< 0,1	UFC/g

Líquido celômico

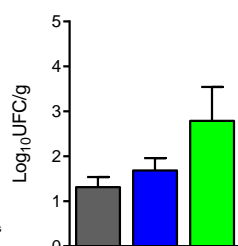


<i>E. coli</i>					< 1	1 mL
MC MacConkey					< 10	1 mL
<i>Enterococcus</i> spp.					< 1	1 mL

Conteúdo edível



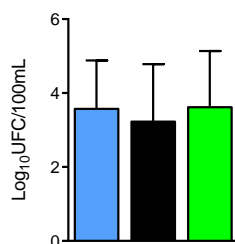
MO aeróbios totais a 7°C
 MO aeróbios totais a 22°C
 MO aeróbios totais a 30°C
 MO aeróbios totais a 37°C
 Bactérias heterotróficas marinhas



<i>E. coli</i>					ausente	0.1 g
MC VRGB					< 18	NMP/100g
MC MacConkey					135	UFC/g
<i>C. perfringens</i>					100	UFC/g
<i>C. perfringens</i>					< 10	UFC/g
Bolores					162	UFC/g
Leveduras					25	UFC/g
<i>Staph. coagulase +</i>					< 100	UFC/g
<i>Enterococcus</i> spp.					< 10	UFC/g
<i>Salmonella</i> spp.					ausente	em 25 g
<i>L. monocytogenes</i>					ausente	em 25 g

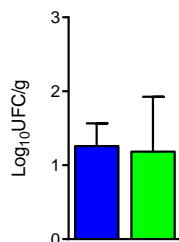
Figura 4.14. Síntese dos resultados das análises realizadas a *P. lividus* da praia de Carreço. Os resultados apresentados nos gráficos correspondem à média \pm desvio padrão das quatro amostragens sazonais realizadas. Os resultados apresentados nas tabelas resumem os resultados obtidos em cada uma das amostragens sazonais. A cor verde indica a não detecção do microorganismo na amostra e a cor vermelha a sua presença. Os valores apresentados na tabela correspondem à média das amostras positivas para o microorganismo correspondente.

Coluna de água



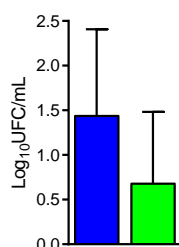
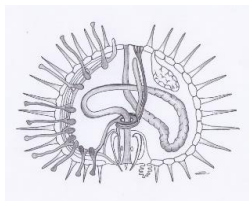
<i>E. coli</i>					105	UFC/100 mL
<i>Enterococcus</i> spp.					158	UFC/100 mL
<i>Salmonella</i> spp.					presente	em 1 L

Biofilme superficial



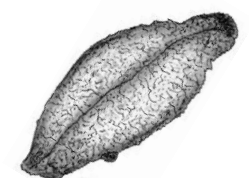
<i>E. coli</i>					< 0,1	UFC/g
MC MacConkey					< 1	UFC/g
<i>Enterococcus</i> spp.					< 0,1	UFC/g

Líquido celômico

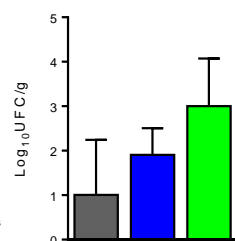


<i>E. coli</i>					< 0,1	UFC/g
MC MacConkey					< 1	UFC/g
<i>Enterococcus</i> spp.					< 0,1	UFC/g

Conteúdo edível



- MO aeróbios totais a 7°C
- MO aeróbios totais a 22°C
- MO aeróbios totais a 30°C
- MO aeróbios totais a 37°C
- Bactérias heterotróficas marinhas



<i>E. coli</i>					< 10	UFC/g
					< 18	NMP/100g
MC VRGB					20	UFC/g
MC MacConkey					250	UFC/g
<i>C. perfringens</i>					< 10	UFC/g
Bolores					37,5	UFC/g
Leveduras					< 25	UFC/g
<i>Staph. coagulase +</i>					< 100	UFC/g
<i>Enterococcus</i> spp.					< 10	UFC/g
<i>Salmonella</i> spp.					ausente	em 25 g
<i>L. monocytogenes</i>					ausente	em 25 g

Figura 4.15. Síntese dos resultados das análises realizadas a *P. lividus* da Praia Norte. Os resultados apresentados nos gráficos correspondem à média \pm desvio padrão das quatro amostragens sazonais realizadas. Os resultados apresentados nas tabelas resumem os resultados obtidos em cada uma das amostragens sazonais. A cor verde indica a não detecção do microorganismo na amostra e a cor vermelha a sua presença. Os valores apresentados na tabela correspondem à média das amostras positivas para o microorganismo correspondente.

4.4. Resistência aos antimicrobianos

À escala nacional e internacional, os programas oficiais para a avaliação de higiene e segurança de bivalves e equinodermes produzidos, capturados e colocados no mercado não contemplam ainda o escrutínio de microrganismos resistentes aos antimicrobianos que possam estar a ser transmitidos através destes animais ⁽¹⁴³⁾.

Porém, um estudo recente descobriu que algumas estirpes de *E. coli* isoladas em marisco, para além de serem patogénicas (produção de toxina *Shiga*) exibiam uma notável capacidade de resistência a cefalosporinas de terceira geração e imipenema ⁽¹⁴⁴⁾. A emergência de estirpes de *E. coli* multiresistentes está a ser alvo de uma atenção particular devido à sua rápida disseminação global ⁽¹⁴³⁾ e à sua capacidade de resistência às fluoroquinolonas, cefalosporinas, carbapenemos ^(145,146), à colistina ⁽¹⁴⁶⁾ e, consequentemente estarem a deixar os serviços de saúde sem opções terapêuticas.

Se tomarmos como referencial as descobertas reveladas em estudos internacionais e alguns trabalhos em que se avaliou a qualidade da água na orla costeira portuguesa ⁽¹⁴⁷⁾ ou em animais intimamente ligados a esse corpo de água ⁽¹⁴⁸⁾, pode-se reconhecer que neste trabalho se registou uma baixa prevalência de resistências aos antimicrobianos em *E. coli* e enterococos isolados nos diferentes compartimentos orgânicos das ostras (Tabela 4.10.) e dos ouriços (Tabela 4.11.), bem como do meio aquático envolvente.

Os apelos das autoridades de saúde para um uso mais prudente dos antibióticos, conjuntamente com a melhoria do tratamento das águas residuais no nosso país e a capacidade depurativa destes animais ^(138,143) poderão explicar, em grande medida, os resultados obtidos. Merece um destaque particular a ausência de resistências ao imipenema (um importante beta-lactâmico usado exclusivamente no meio hospitalar para o tratamento de infeções graves), pois têm vindo a ser detetadas resistências a este carbapenema em rios portugueses ⁽¹⁴⁹⁾.

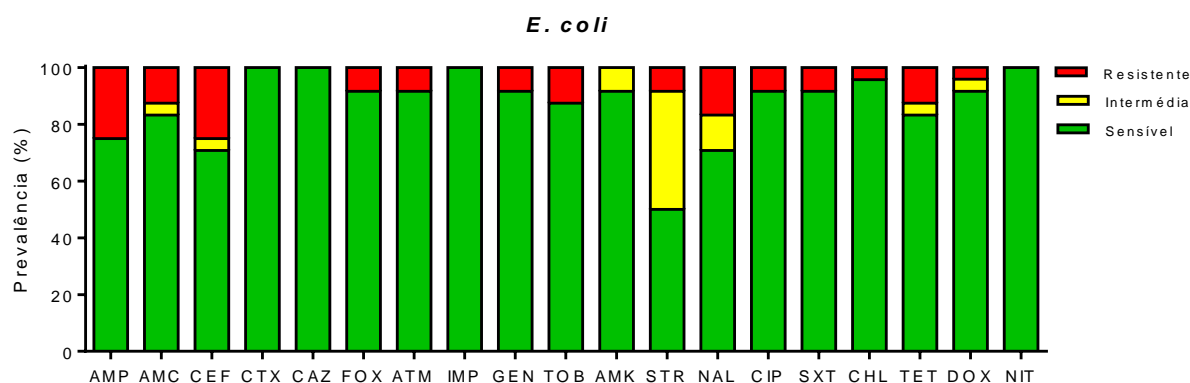


Figura 4.16. Prevalência da resistência aos antibióticos estudados nos isolados de *E. coli* recuperados a partir das amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro. Foram estudados 24 isolados recuperados a partir de meios de cultura sem antibióticos, dos quais 12 foram obtidos de amostras de água, 1 de amostras de biofilme superficial, 1 de amostras de líquido intravalvar e 10 de amostras do conteúdo edível. AMP – ampicilina, AMC – amoxicilina/ácido clavulânico, CEF – cefalotina, CTX – cefotaxima, CAZ – ceftazidima, FOX – ceftoxitina, ATM – aztreonam, IMP – imipenema, GEN – gentamicina, TOB – tobramicina, AMK – amicacina, STR – estreptomicina, NAL – ácido nalidíxico, CIP – ciprofloxacina, SXT – trimetoprima/sulfametoxazole, CHL – cloranfenicol, TET – tetraciclina, DOX – doxiciclina, NIT – nitrofuratoína.

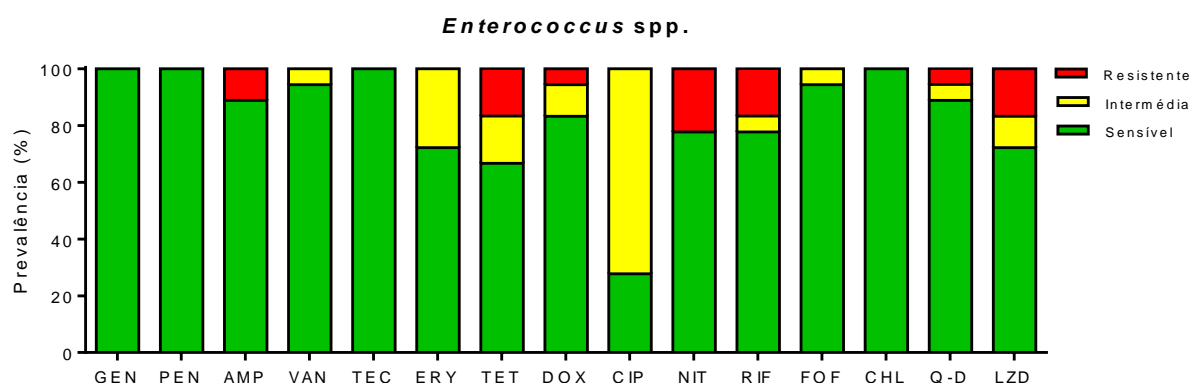


Figura 4.17. Prevalência da resistência aos antibióticos estudados nos isolados de *Enterococcus spp.* recuperados a partir das amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro. Foram estudados 24 isolados recuperados a partir de meios de cultura sem antibióticos, dos quais 9 foram obtidos de amostras de água, 8 de amostras de biofilme superficial e um de amostras de líquido intravalvar. GEN – gentamicina, PEN – penicilina, AMP – ampicilina, VAN – vancomicina, TEC – teicoplanina, ERY – eritromicina, TET – tetraciclina, DOX – doxiciclina, CIP – ciprofloxacina, NIT – nitrofuratoína, RIF – rifampicina, FOF – fosfomicina, CHL – cloranfenicol, Q-D – quinupristina/dalfopristina, LZD – linezolida.

No caso particular das ostras, é também muito positiva a não deteção em *E. coli* de qualquer resistência às cefalosporinas de terceira geração: cefotaxima e ceftazidima, nem a deteção de resistências à vancomicina em enterococos. Merece, no entanto, alguma preocupação a frequência de resistências às aminopenicilinas, cefalosporinas de segunda geração e ácido nalidíxico nos isolados de *E. coli* (Fig. 4.16.), bem como a prevalência de resistências à ampicilina e linezolid nos enterococos (Fig. 4.17.).

Relativamente aos ouriços, somente não se detetaram resistências ao imipenema e cloranfenicol em *E. coli* (Fig. 4.18.), sendo particularmente inquietantes os níveis de resistência aos betalactâmicos,

aminoglicosídeos e ciprofloxacina. A detecção de dois enterococos resistentes à vancomicina deverá merecer uma atenção particular em estudos futuros com o propósito de identificar o gene de resistência (Fig. 4.19.)

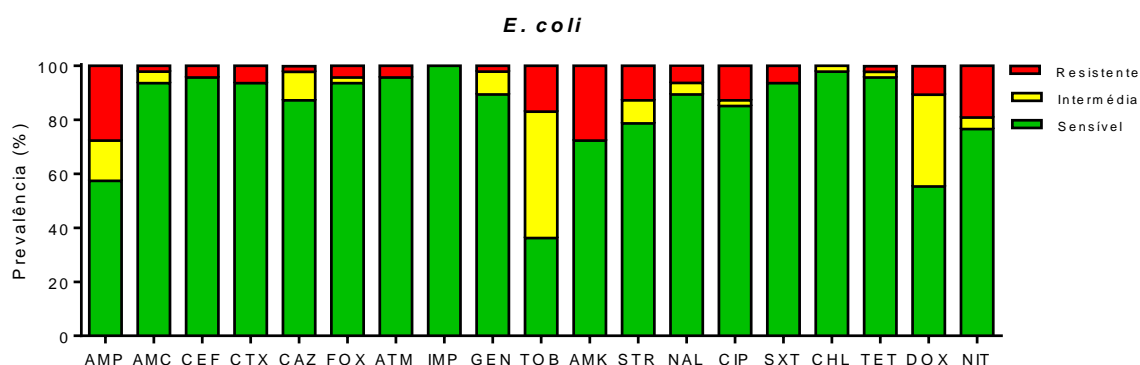


Figura 4.18. Prevalência da resistência aos antibióticos estudados nos isolados de *E. coli* recuperados a partir das amostras recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo. Foram estudados 47 isolados recuperados a partir de meios de cultura sem antibióticos, 33 provenientes de amostras recolhidas na Praia de Carreço e 14 provenientes de amostras recolhidas na Praia Norte. 44 foram obtidos de amostras de água, 1 de amostras de biofilme superficial e 2 de amostras das gónadas (conteúdo edível). AMP – ampicilina, AMC – amoxicilina/ácido clavulânico, CEF – cefalotina, CTX – cefotaxima, CAZ – ceftazidima, FOX – cefoxitina, ATM – aztreonam, IMP – imipenema, GEN – gentamicina, TOB – tobramicina, AMK – amicacina, STR – estreptomicina, NAL – ácido nalidíxico, CIP – ciprofloxacina, SXT - trimetoprima/sulfametoxazole, CHL – cloranfenicol, TET – tetraciclina, DOX – doxiciclina, NIT – nitrofuratoína.

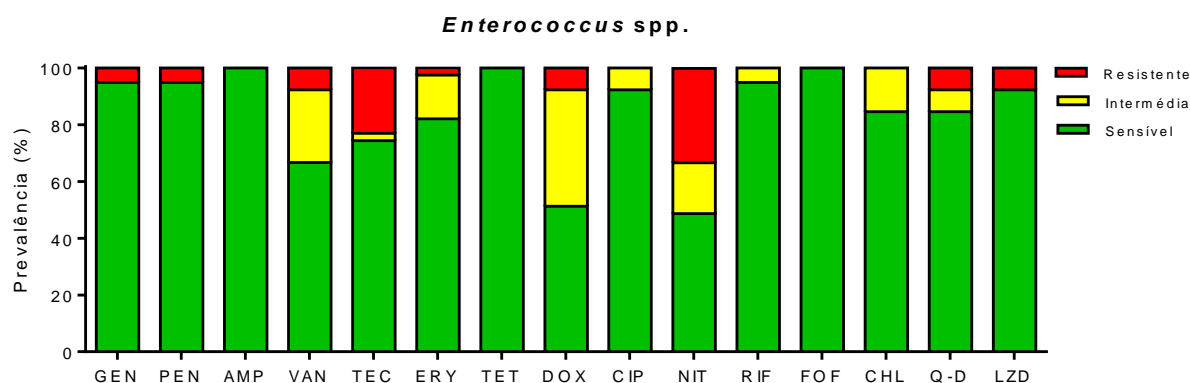


Figura 4.19. Prevalência da resistência aos antibióticos estudados nos isolados de *Enterococcus spp.* recuperados a partir das amostras recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo. Foram estudados 39 isolados recuperados a partir de meios de cultura sem antibióticos, 23 provenientes de amostras recolhidas na Praia de Carreço e 16 provenientes de amostras recolhidas na praia do Norte. 21 foram obtidos de amostras de água e 2 de amostras de biofilme superficial. GEN – gentamicina, PEN – penicilina, AMP – ampicilina, VAN – vancomicina, TEC – teicoplanina, ERY – eritromicina, TET – tetraciclina, DOX – doxiciclina, CIP – ciprofloxacina, NIT – nitrofuratoína, RIF – rifampicina, FOF – fosfomicina, CHL – cloranfenicol, Q-D – quinupristina/dalfopristina, LZD – linezolida.

No tocante à análise fenotípica, os isolados com maior número de resistências simultâneas foram recuperados a partir das amostras de água recolhidas nos três pontos avaliados: na amostragem de inverno das ostras e na amostragem da primavera dos ouriços (Tabelas 4.10. e 4.11.). Foi, precisamente, a partir desta última amostra que se recuperaram as duas únicas estirpes de *E. coli* produtoras de

carbapenemase de amplo espectro (*Extended-spectrum beta-lactamases* - ESBL) (Fig. 4.20.). Estas estirpes são particularmente preocupantes para a saúde pública em virtude de terem a capacidade de inativar a generalidade dos antibióticos β -lactâmicos, com a exceção dos carbapenemas⁽¹⁵⁰⁾.

A sua presença não deverá ser considerada surpreendente em virtude da água e dos sedimentos marinhos serem densamente povoados não só por microrganismos indígenas, mas também por bactérias oriundas de populações humanas e de animais sujeitas a tratamentos com antibióticos.

Importa manter presente que, após a administração aos humanos ou aos animais, os agentes antimicrobianos são em grande parte excretados na sua forma ativa através das fezes e da urina. Estes resíduos, conjuntamente com os microrganismos resistentes que selecionam ultrapassam facilmente as ETAR^(149,151–153) e disseminam-se numa proporção significativa da biosfera, particularmente nos corpos de água que recebem estes efluentes, nomeadamente a orla costeira marítima (mais povoada) que, assim, acumula um importante conjunto de bactérias e genes de resistência. Adicionalmente, este ambiente proporciona as condições ideais para o desenvolvimento de novas resistências em bactérias marinhas e em bactérias de origem terrestre, incluindo as espécies patogénicas para humanos e animais (Fig.1.12.).

A possibilidade dessas bactérias resistentes serem “devolvidas” aos humanos aumenta, proporcionalmente, com a sua presença no conteúdo edível de ostras e de ouriços. Neste âmbito, poderemos considerar preocupante o isolamento de quatro fenótipos MDR nas amostras analisadas. Estas bactérias representam um risco potencial para os seres humanos, quer através da transferência clonal destas bactérias, quer pela transferência horizontal de elementos genéticos móveis que codificam a resistência para outros microrganismos comensais ou patogénicos (previamente suscetíveis) que nos colonizam.

Porém, nenhum desses isolados era ESBL ou exibia resistência adquirida a antimicrobianos de última linha e com maior relevância terapêutica. Este facto é particularmente relevante se tivermos em consideração a forma como os ouriços e as ostras se alimentam (sobretudo as últimas, em virtude dos grandes volumes de água que filtram) e o facto de ter sido detetada nas amostras de água recolhidas nas zonas de produção uma grande diversidade de estirpes multirresistentes (entre as quais *E. coli* produtoras de beta lactamases de amplo espectro e enterococos resistentes à vancomicina).

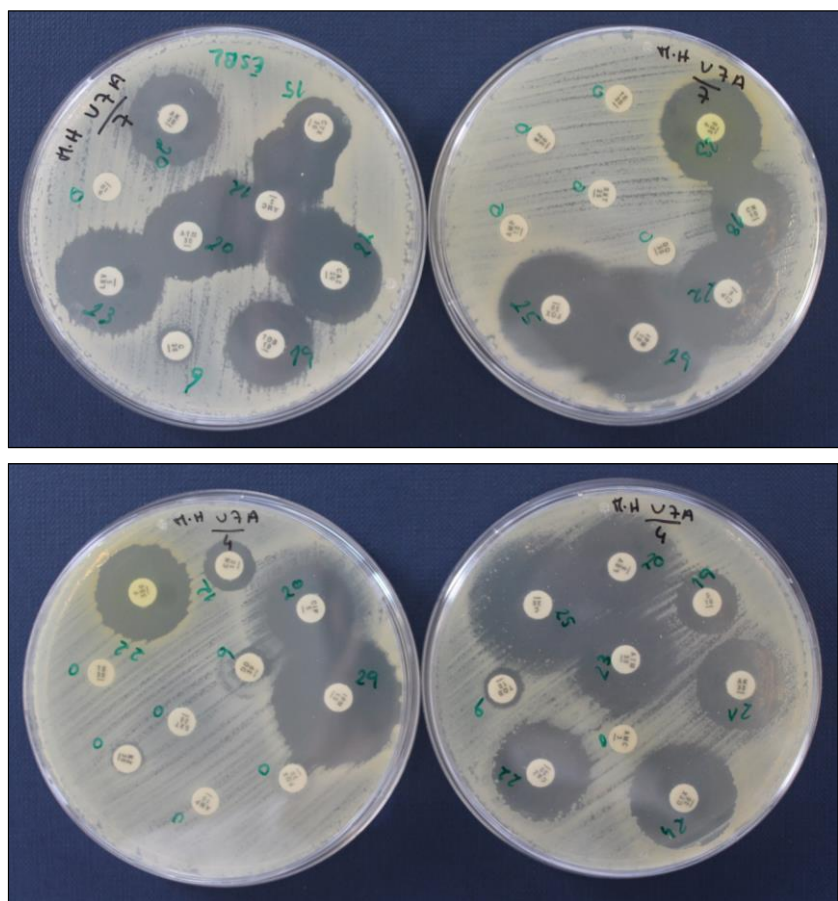


Figura 4.20. Antibiogramas de dois isolados de *E. coli* multirresistentes aos antimicrobianos obtidos a partir de amostras de água recolhidas na praia Norte. O isolado retratado na imagem superior é ESBL.

Tabela 4.10. Caracterização das estirpes MDR presentes nas amostras recolhidas no Canal de Mira da Ria de Aveiro.

<i>Escherichia coli</i>				
Perfil de resistência	Isolado	Data	Local	Amostra
AMP ^R STR ^R TET ^R DOX ^I CIP ^R SXT ^R CEF ^I NAL ^R	1	29-07-2016	Canal Mira	Água
AMP ^R AMC ^R STR ^I TET ^I CEF ^R	2	23-11-2016	Canal Mira	Conteúdo edível
GEN ^R STR ^I TET ^R CEF ^R NAL ^R	3	24-01-2017	Canal Mira	Conteúdo edível
AMP ^R AMC ^R FOX ^R CEF ^R NAL ^R	4	24-01-2017	Canal Mira	Conteúdo edível
AMP ^R AMC ^R FOX ^R	5	24-01-2017	Canal Mira	Biofilme superficial
AMP ^R AMC ^I GEN ^R TOB ^R STR ^R TET ^R DOX ^R CIP ^R SXT ^R CHL ^R CEF ^R NAL ^I	6	24-01-2017	Canal Mira	Água
STR ^I TET ^R DOX ^R CEF ^R	7	24-01-2017	Canal Mira	Água
STR ^R TET ^R DOX ^R NAL ^R	8	24-01-2017	Canal Mira	Água
<i>Enterococcus</i> spp.				
Perfil de resistência	Isolado	Data	Local	Amostra
ERY ^I TET ^I DOX ^R RIF ^R FOF ^I Q-D ^I LZD ^R	1	23-11-2016	Canal Mira	Água

Tabela 4.11. Caracterização das estirpes MDR presentes nas amostras recolhidas nas praias de Carreço e do Norte em Viana do Castelo.

<i>Escherichia coli</i>				
Perfil de resistência	Isolado	Data	Local	Amostra
AMP ^R ATM ^R STR ^I TET ^R DOX ^R NAL ^R	1	01-09-2016	Carreço	Biofilme superficial
AMP ^R TET ^R DOX ^R NAL ^R	2	01-09-2016	Carreço	Conteúdo edível
FOX ^R CTX ^I ATM ^R TET ^R DOX ^I CEF ^I NAL ^R	3	02-09-2016	Norte	Água
AMP ^R CAZ ^R AMI ^I STR ^I TET ^R CEF ^R NAL ^I	4	15-02-2017	Carreço	Água
AMP ^R TET ^R DOX ^R CIP ^R CEF ^I	5	15-02-2017	Carreço	Água
AMP ^R AMC ^I GEN ^R TOB ^R AMK ^I STR ^R CEF ^I	6	15-02-2017	Carreço	Água
AMP ^R STR ^R TET ^R DOX ^R CIP ^R SXT ^R CHL ^R NAL ^R	7	15-02-2017	Carreço	Água
AMP ^R AMK ^R STR ^R TET ^R DOX ^I SXT ^R CHL ^R	8	16-02-2017	Norte	Água
AMP ^R AMC ^I STR ^R TET ^R DOX ^I SXT ^R CEF ^I NAL ^R	9	25-05-2017	Carreço	Água
AMP ^R AMC ^R FOX ^R CTX ^I GEN ^R TOB ^R TET ^R DOX ^R CIP ^I SXT ^R CEF ^R NAL ^R	10	25-05-2017	Carreço	Água
STR ^R CIP ^R SXT ^R NAL ^R	11	25-05-2017	Carreço	Água
AMP ^R CTX ^R ATM ^I STR ^R TET ^R DOX ^R SXT ^R CHL ^R CEF ^R	12	25-05-2017	Carreço	Água
AMP ^R STR ^R TET ^R DOX ^R SXT ^R CEF ^I NAL ^R	13	25-05-2017	Carreço	Água
AMP ^R AMC ^I STR ^R TET ^R DOX ^I CIP ^R SXT ^R CEF ^I NAL ^R	14	26-05-2017	Norte	Água
ESBL	15	26-05-2017	Norte	Água
	16	26-05-2017	Norte	Água
ESBL	17	26-05-2017	Norte	Água
<i>Enterococcus spp.</i>				
Perfil de resistência	Isolado	Data	Local	Amostra
AMP ^R PEN ^R TET ^R DOX ^I RIF ^I Q-D ^R	1	15-02-2017	Carreço	Biofilme superficial
	2	25-05-2017	Carreço	Biofilme superficial
ERY ^I TET ^R DOX ^R CIP ^R	3	25-05-2017	Carreço	Água
TET ^R CIP ^R RIF ^R	4	25-05-2017	Carreço	Água

5 Conclusão

5.1. Apreciação Global

A seleção dos microrganismos a pesquisar, o método de análise e o plano de amostragem procurou respeitar, na medida do possível, o estabelecido no Regulamento (CE) nº 2073 /2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Ainda assim, foi necessário reunir informação complementar e debater algumas questões com especialistas do IPMA envolvidas nos controlos oficiais.

Para o controlo de *Salmonella* spp., cada amostra deve ser constituída por cinco unidades sem que, no entanto, o Regulamento ou a Norma EN/ISO 6579 esclareçam quantas ostras devem integrar cada uma dessas unidades, tendo-se optado por *pools* constituídos por 5 ostras e 4 ouriços. O menor número de ouriços em cada unidade de amostra ficou-se a dever à deteção pela equipa de apanha de uma redução substancial da população selvagem de ouriços nas praias amostradas ao longo do estudo. As unidades de amostra também foram equacionadas tendo em conta a disponibilidade de amostra e a representatividade de cada zona/local de produção ou o grupo-teste a analisar.

Para o controlo de *Listeria monocytogenes* colocou-se a mesma dúvida relativa ao número de ostras ou ouriços em cada unidade da amostra. Emergiu, no entanto, uma questão adicional: o regulamento prevê que, em circunstâncias normais, não é necessário realizar a pesquisa desta espécie bacteriana em determinados alimentos prontos para consumo, nomeadamente moluscos bivalves vivos. Tal preceito não isenta o controlo nos ouriços e deixa a porta aberta para, em determinadas circunstâncias, também ser necessário controlar as ostras, tal como realizado neste trabalho.

Levantou-se, porém, uma terceira questão relativa à metodologia e ao critério de apreciação dos resultados: são ou não as ostras e os ouriços suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*? Se tivermos em conta que as ostras e os ouriços têm uma vida útil inferior a 5 dias, a resposta será negativa e ambos devem ser incluídos no controlo 1.3. (alimentos não suscetíveis de permitir o crescimento da bactéria). Contudo, acontece que a vida útil (validade) das ostras e dos ouriços deve ser norteadada pela obrigatoriedade destes serem consumidos vivos e não propriamente por uma validade convencional definida em dias. Assim, tendo em conta que este período pode oscilar entre os 4 e os 6 dias, estes animais deveriam ser colocados na categoria de alimentos suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*. Nessa circunstância, abre-se um novo dilema: pode o operador (produtor/recoletor/fornecedor) demonstrar que o produto não excederá o limite de 100 UFC/g até ao termo do período de vida útil? Se a resposta for positiva, o controlo microbiológico deverá ser realizado através de um método quantitativo (norma ISO 11290-parte 2) e o limite máximo de aceitabilidade deverá ser fixado em 100 UFC/g. Caso tal não se possa garantir, o limite deverá ser mais exigente

(ausente em 25 g) e a pesquisa deverá ser realizada de acordo com o método qualitativo (norma ISO 11290-parte 1).

Apesar de alguns estudos demonstrarem que *L. monocytogenes* não se multiplica em moluscos bivalves vivos e que, quer as ostras, quer os ouriços amostrados não se encontrarem ainda colocados no mercado, optamos pelo método mais sensível. Os resultados obtidos em todas as amostras recompensaram tal opção, em virtude de não ter sido detetada qualquer colónia suspeita.

A última questão relativa à estratégia para avaliar a segurança microbiológica do conteúdo edível de ostras e ouriços é respeitante a *E. coli*. Na versão inicial do regulamento em questão, as ostras deviam integrar uma amostra coletiva para a quantificação de *E. coli*. Com as alterações introduzidas pelo Regulamento (CE) nº 2285/2015, o controlo de *E. coli* (entrada 1.25) passou a ser realizada em cinco unidades de amostra processadas independentemente, remetendo para a norma EN/ISO 16649-3 a definição do número mínimo de animais em cada unidade de amostra: 10 exemplares. Sendo que foram usados 109 ostras e 113 ouriços ao longo do ensaio.

5.2. Conclusões do estudo

As análises de água das zonas de produção revelaram que no Canal de Mira, mesmo sendo um corpo de água semifechado, parece ser dotado de mecanismos (físicos, químicos e biológicos) de descontaminação microbiológica muito eficazes. Esta constatação é particularmente relevante nas bactérias de origem fecal, em virtude da grande urbanização envolvente fazer prever valores bastante mais elevados que os detetados neste trabalho.

Já a monitorização do biofilme superficial das ostras, bem como do líquido intravalvar não indicaram qualquer fenómeno de concentração de bactérias de origem fecal comparativamente à sua presença na coluna de água e, à semelhança de outros estudos efetuados em bivalves, confirmou-se a capacidade depuradora destes animais. Não foi detetado, igualmente, qualquer enterococos ou isolados com crescimento em *MacConkey* nas amostras de hemolinfa, nem no biofilme superficial (Praia Norte), nem do líquido celómico dos ouriços-do-mar.

Apesar de se ter detetado a presença *Salmonella* spp. nas águas conquícolas amostradas, não se detetou a presença desta bactéria em nenhuma das amostras de conteúdo edível tanto nas ostras como nos

ouriços, corroborando a baixa incidência de casos associados ao consumo destes produtos e demonstrando a capacidade das ostras e equinodermes “depurarem” esta bactéria.

A deteção de *Salmonella* spp. em três amostras (em duas amostras de água recolhidas na ria de Aveiro e numa amostra recolhida na praia Norte é motivo para grande preocupação, não só pelo risco de contaminação de produtos da pesca, mas também pelos riscos de saúde pública (para quem pratica atividades de recreio nestas águas) e riscos de saúde ambiental, decorrentes da possibilidade de contaminação da avifauna silvestre. Neste cenário, uma grande diversidade de animais podem passar a ser reservatórios e vetores (introdução noutros habitats e populações animais) deste importante agente zoonótico responsável por um total de 88 715 casos confirmados de toxinfecção alimentar na União Europeia em 2014, resultando numa rácio de notificação de 23,4 casos por 100 000 habitantes ⁽¹⁵⁴⁾. Apesar de se ter registado um incremento de 15,3% de casos relativamente a 2013, no período de tempo entre 2008 e 2014 verificou-se um decréscimo muito significativo no número de casos de salmonelose, em virtude das sistemáticas e eficazes medidas de controlo aplicadas ao sector avícola; reconhecidamente a principal fonte emissora (alimentar e ambiental) de *Salmonella* spp.

No presente estudo verificou-se que o conteúdo edível contém menos bactérias heterotróficas marinhas e muito menos microrganismos totais com crescimento em *Plate Count Agar* que o verificado no somatório da hemolinfa e do líquido intravalvar (partes integrantes do conteúdo edível), demonstrando que as restantes partes do corpo da ostra (*e.g.* músculo adutor, brânquias, manto, aparelho digestivo) apresentam uma carga microbiológica muito inferior. No entanto, tal constatação não é extensível à contaminação por *E. coli* e, de uma forma mais lata, às bactérias com crescimento em *MacConkey*, devendo ser avaliado em trabalhos futuros qual ou quais as estruturas e órgãos em que estas bactérias se possam acumular em valores superiores aos registados na hemolinfa e líquido intravalvar. Os valores obtidos de *E. coli* no conteúdo edível das ostras amostradas eram respetivos a ZPB de classe A, apesar de serem produzidas numa ZPB de classe B.

Quanto à *Listeria monocytogenes*, não foi detetada a sua presença quer no conteúdo edível das ostras, quer dos ouriços amostrados.

Neste trabalho foi registada uma baixa prevalência de resistências aos antimicrobianos nos isolados de *E. coli* e enterococos recuperados a partir das amostras dos diferentes compartimentos orgânicos das ostras e dos ouriços, bem como do meio aquático envolvente.

Em suma, todas as amostras de ostras e de ouriços devem ser consideradas satisfatórias/aceitáveis para consumo *in natura* pelo consumidor, uma vez que estas não ultrapassaram o limite de contaminação por *E. coli* (classe B no caso das ostras) e enterococos, nem revelaram a presença de estafilococos coagulase-positiva, *Salmonella* spp., nem de *Listeria monocytogenes*.

6

Referências bibliográficas

1. Codex Alimentarius Commission. Code of Hygienic Practice for Precooked and Cooked Foods in Mass Catering. In: Codex Alimentarius Commission, editor. CAC/RCP-39. Rome; 1993.
2. Baptista, P., Antunes C. Higiene e segurança alimentar na restauração. Vol. 2, Forvisão. Guimarães; 2005.
3. FSA of I. HACCP: A food safety management system, Catering. Food safety-Authority Ireland.
4. WHO/FAO RCAC. Codex Alimentarius: recommended international code of practice general principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. 2003; Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>
5. WHO. Foodborne diseases. 2012; Disponível em: http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/
6. Soares E. Doenças de Origem Alimentar – Infecções e Intoxicações. Revista Segurança e Qualidade Alimentar. 2007;6–8. Disponível em: <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-02/SEQUALI-02.pdf>
7. Adams, M. R. & Moss MO. Food microbiology. 3rd ed. Cambridge, UK: RSCPublishing; 2008. Disponível em: <http://197.14.51.10:81/pmb/AGROALIMENTAIRE/Food Microbiology.pdf>
8. U.S. Public Health Service F. Food Code. 2013. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/UCM374510.pdf>.
9. T&N. Tráfego internacional de cruzeiros aumentou 6 %. Transporte & Negócios; 2017. Disponível em: <http://www.transportesenegocios.pt/trafego-internacional-de-cruzeiros-aumentou-6/>
10. Rooney RM, Cramer EH, Mantha S, Nichols G, Bartram JK, Farber JM, et al. A review of outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: evidence for risk management. Public Health Rep. 2004;119(4):427–34.
11. CRAMER E, BLANTON C, BLANTON L, VAUGHANJR G, BOPP C, FORNEY D, et al. Epidemiology of Gastroenteritis on Cruise Ships, 2001–2004. Am J Prev Med. 2006 Mar 12;30(3):252–7.
12. Minooee A, Rickman LS. Infectious Diseases on Cruise Ships.; Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/99fb/418843923097547e98f05793a2018d92c6e1.pdf>
13. Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S, Le Pendu J, Atmar RL, Crawford SE, et al. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. Appl Environ Microbiol. 2011;77(10):3189–96.
14. Nenonen NP, Hannoun C, Olsson MB, Bergström T. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. J Clin Virol. 2009;45(2):105–8.
15. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: A comprehensive review. J Clin Virol. 2009;44(1):1–8.
16. Vaz-Pires P. Tecnologia do pescado. 2006. Disponível em: http://www.icbas.up.pt/~vazpires/pessoal_files/tecnologia_pescado_files/PPapontam2006.pdf
17. DOALOS/OLA- United Nations. Act No. 33/77 of 28 May 1977 regarding the juridical status of the Portuguese Territorial Sea and the Exclusive Economic Zone. Disponível em: http://www.un.org/Depts/los/LEGISLATIONANDTREATIES/PDFFILES/PRT_1977_Act.pdf
18. Ababouch L, J. Alder AA, Barg U, Bartley, Bernal M, Bianchi G. the State of World Fisheries and Aquaculture. 2016.
19. FAO. Total fish consumption per capita (kg) and fish contribution to total animal proteins (%) -

- Globefish. 2015. Disponível em: http://test3.2openlab.it/fao_globefish/total-fish-consumption-per-capita-kg-and-fish-contribution-to-total-animal-proteins.html
20. DGRM. Produção em aquicultura | Estado do Ambiente em Portugal. 2017. Disponível em: <https://rea.apambiente.pt/node/132>
 21. Lourenço, H.M.Cardoso, C.,Afonso C. Avaliação de riscos de contaminantes químicos inorgânicos em pescado. In: Riscos e Alimentos, 4, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica -ASAE. p. 7–10.
 22. FAO Fisheries and Aquaculture Report, 978 F and AO of the UNHO-F. Report of the joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption. 2010; Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/014/ba0136e/ba0136e00.pdf>
 23. Soares KM de P, Gonçalves AA. Qualidade e segurança do pescado. Rev do Inst Adolfo Lutz [Internet]. 2012;71(1):1–10. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552012000100001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 24. Pinho T. Consumo de pescado cru: inquérito sobre o consumo e a perceção dos riscos. 2015.
 25. Comité Técnico ISO/TC 34. Np En Iso 22000:2005. 2005; Disponível em: <http://www.acice.pt/2sem.qualidade/np.pdf>
 26. Abelho M. Manual de Monitorização Microbiológica Ambiental [Internet]. 2012. Disponível em: http://www.esac.pt/Abelho/Monitor_ambiental/ManualMonitorizacao.pdf
 27. Wanda F. Canas Ferreira, João Carlos F. de Sousa NL. Microbiologia - Microbiologia da água [Internet]. Lisboa: Lidel; 2010 [cited 2017 Jul 3]. 506-522 p. Available from: <https://www.lidel.pt/pt/catalogo/ciencias-fundamentais/microbiologia/microbiologia/>
 28. DGRM. Comer Peixe de Aquicultura. 2007. Disponível em: https://www.dgrm.mm.gov.pt/xeo/attachfileu.jsp?look_parentBoui=170448&att_display=n&att_download=y.
 29. Félix S. Revisão do sistema HACCP da plataforma de pescado fresco Auchan. Universidade Técnica de Lisboa; 2012.
 30. Baptista Paulo LM. Higiene e Segurança Alimentar na Restauração- Volume I - Iniciação [Internet]. 1ª. Forvisão - Consultoria em Formação Integrada SA, editor. Guimarães; 2005. Disponível em: http://www.forvisao.pt/files/manuais_1.pdf
 31. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. Guidelines for risk-based fish inspection. 2009. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0468e/i0468e00.pdf>
 32. Stockholm convention on persistent organic pollutants. Disponível em: http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/convention_text/UNEP-POPS-COP-CONVTEXT-FULL.English.PDF
 33. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica- ASAE. A contaminação do peixe com mercúrio: avaliação risco/benefício do consumo de peixe. 2015. Disponível em: <http://www.papabem.pt/content/contaminação-do-peixe-com-mercúrio-avaliação-riscobenefício-do-consumo-de-peixe>
 34. Baptista P, Venâncio A. Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. Vol. 4, Os Perigos para a Segurança Alimentar no Processamento de Alimentos. 2003. 25-32 p.
 35. Veiga A, Lopes A, Carrilho E, Silva L, Dias MB, Seabra MJ, Borges M, Fernandes P, Nunes S FSa de

SA e E-A. “Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal”. Lisboa; 2009. Disponível em: <https://www.yumpu.com/pt/document/view/7715505/perfil-de-risco-dos-principais-alimentos-consumidos-em-portugal-fipa>

36. Autoridade de Segurança Alimentar e Económica- ASAE. Riscos do consumo de peixe: Metilmercúrio. Riscos e Alimentos, nº 4. 2012
37. Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os valores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios. J. Oficial da União Eur.; 2006(8):L 364/5-L 364/24.
38. Regulamento (CE) n.º 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. 2010;
39. Food and Drug Administration – FDA. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance [Internet]. 4ª. 2011. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/ucm251970.pdf>
40. Silva, H.A.; Batista I. Produção, salubridade e comercialização dos moluscos bivalves em Portugal. Publicações Avulsas do IPIMAR (Portugal) no. 20. 2008. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015001213>
41. EFSA. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. EFSA. 2010; 8(4):1543. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2010.1543>
42. Fayer R, Farley CA, Lewis EJ, Trout JM, Graczyk TK. Potential Role of the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, in the Epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. Appl. Environ Microbiol. 1997 May;63(5):2086–8.
43. Regulamento (CE) Nº 853/2004 que estabelece as regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. J. Oficial Eur. 2004
44. Regulamento (CE) nº 1276/2011 da Comissão de 8 de dezembro de 2011 que altera o anexo iii do Regulamento (ce) nº 853/2004 do parlamento europeu e do conselho no que se refere ao tratamento para eliminar parasitas viáveis em produtos da pesca destinados . 2011. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/lexuriserv/lexuriserv.do?uri=oj:l:2011:327:0039:0041:pt:pdf>
45. Vale P. Biotoxinas marinhas. Ver. Port. Ciências Veterinárias. 2004; Disponível em: http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf3_2004/549_03_18.pdf
46. Regulamento (CE) N.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. J.Of. da União Eur. 2004; Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0854&qid=1492276566324&from=PT>
47. Fong T-T, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. Microbiol. Mol. Biol. Ver. 2005; 69(2):357–71.
48. Carmen Vasconcelos. Surto do norovírus pode ser evitado com higiene pessoa, água e alimentos. 2015. Disponível em: <http://www.correio24horas.com.br/detalhe/saude/noticia/surto-do-norovirus-pode-ser-evitado-com-higiene-pessoa-agua-e-alimentos/?cHash=7043ce87feee796b043a22ba579ff736>
49. Cabral JPS. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. Int. J. Environ. Res. Public Health.

2010;7(10):3657–703.

50. Mesquita JR, Vaz L, Cerqueira S, Castilho F, Santos R, Monteiro S, et al. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiology*. 2011;28(5):936–41.
51. Torok V. Review of Foodborne Viruses in Shellfish and Current Detection Methodologies. 2013.
52. Casas N, Amarita F, de Marañón IM. Evaluation of an extracting method for the detection of Hepatitis A virus in shellfish by SYBR-Green real-time RT-PCR. *Int J Food Microbiol*. 2007;120(1–2):179–85.
53. Jay JM. *Modern Food Microbiology*. Publishers A, editor. Detroit, Michigan; 2000.
54. Butt AA, Aldridge KE, Sanders C V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4(4):201–12.
55. Huss.H.H - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura - FAO. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. Roma; 1997. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/T1768P/T1768P00.htm#TOC>
56. Green TJ, Barnes AC. Bacterial diversity of the digestive gland of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* infected with the paramyxean parasite, *Marteilia sydneyi*. *J Appl. Microbiol*. 2010;109(2):613–22.
57. Johnson EA. *Clostridium botulinum*. 1999;458–62.
58. Feldhusen F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect*. 2000; 2(13):1651–60.
59. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey WR (William R. Baileys & Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Elsevier Mosby; 2007. 1031 p. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/bailey-and-scotts-diagnostic-microbiology/forbes/978-0-8089-2364-0>
60. Ramirez E, Robles E, Gonzalez ME, Elena Martinez M. Microbiological and physicochemical Quality of Well Water Used as a source of public supply. *Air, Soil Water Res*. 2010;3:105–12.
61. Microbial FD, Boston G, Reinhold VN. Boston: Jones & Bartlet. Hardy KG (1986). 1999;(1987):940–5.
62. Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiol*. 1999; 47(1–2):1–24.
63. Celico F, Varcamonti M, Guida M, Naclerio G. Influence of precipitation and soil on transport of fecal enterococci in fractured limestone aquifers. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004;70(5):2843–7.
64. FAO. Cultured Aquatic Species Information Programme - *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en
65. David Monniaux. The Rhode Island Marine & Estuarine Invasive Species. Pacific Oyster :*Crassostrea gigas*. 2010. Disponível em: <http://www.rimeis.org/species/crassostrea.html>
66. Soares DF. Crescimento e Qualidade microbiológica das ostras produzidas em cultivos multitróficos versus monocultivos. 2015.
67. Rigotto C, Caroline. Proposta da utilização de adenovírus como indicadores de contaminação viral humana em ostras de cultivo. 2003; Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/106548>

68. Orban, E. , Di Lena, G. Nevigato, T. Casini, I. Caproni, R. Santaroni G, Giulini G. Nutritional and commercial quality of the striped venus clam, *Chamelea gallina*, from the Adriatic sea. *Food Chem.* 2007;1063–70.
69. Regulamento (CE) n.º 854/2004 do Parlamento europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. 2004.
70. Boudouresque, C.F., Verlaque M 2007. Ecology of *Paracentrotus lividus*. In: (Eds.) JML, editor. *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, *Edible sea urchins : biology and ecology*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 419.
71. Raposo AIG. Biologia reprodutiva do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) e o efeito de três dietas no desenvolvimento das suas gónadas. 2017. Disponível em: https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/2575/1/Tese Andreia Final_VDG.pdf
72. Sue Scott. MarLIN - The Marine Life Information Network. Purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*). 2007. Disponível em: <http://www.marlin.ac.uk/species/detail/1499>
73. Ribeiro-Costa CS, Rocha RM da. Echinodermata In *Invertebrados: manual de aulas práticas*. 2nd ed. Holos, editor. Ribeirão Preto: Holos, Editora Ltda; 2006. 198-213 p.
74. Bárbara Kirmes, Camila Rodrigues Gonçalves I de OM e SP da S, L. Disponível em: <http://zoologia-ii-ufes-turma-i.webnode.com/products/echinodermata1/>
75. Salas-Rojas M, Galvez-Romero G, Anton-Palma B, Acevedo R, Blanco-Favela F, Aguilar-Setién A. The coelomic fluid of the sea urchin *Tripneustes depressus* shows antiviral activity against Suid herpesvirus type 1 (SHV-1) and rabies virus (RV). *Fish Shellfish Immunol.* 2014;36(1):158–63.
76. Stabili L, Pagliara P, Roch P. Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Comp Biochem Physiol Part B.* 1996;113(3):639–44.
77. Anónimo. Filo Equinodermata, Echinodermata, Equinodermos, Classificação Filo Equinodermata. Disponível em: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/biologia/filo-equinodermata>
78. Catherine Fernandez C-FB. Nutrition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different artificial food. *Mar. Ecol. Prog. Ser. Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2000;204:131–41. Disponível em: <http://www.int-res.com/articles/meps/204/m204p131.pdf>
79. Abraham ER. Sea urchin feeding fronts. 2006 Oct 1; Disponível em: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0610004>
80. Iratxe Menchaca. SINC. Proponen el uso de embriones de erizo de mar para evaluar la calidad del medio marino [Internet]. 2011; Disponível em: <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Proponen-el-uso-de-embriones-de-erizo-de-mar-para-evaluar-la-calidad-del-medio-marino>
81. Savriama Y, Stige LC, Gerber S, Pérez T, Alibert P, David B, et al. The role of echinoderms as bioindicators of seawater pollution: A case study from patraicos and corinthiacos Gulf, N. Peloponnesus, Greece. *Ecol Indic.* 1997;54(1–4):39–47. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02772249709358443>
82. Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(6):526–30.
83. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318–22.

84. Lisboa UDE. Crescimento do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* em viveiro na zona costeira da Ericeira, Portugal. 2012
85. Boudouresque CF, Verlaque M. Chapter 21 - *Paracentrotus lividus*. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. 2013. p. 297–327.
86. Garmendia JM, Menchaca I, Belzunce MJ, Franco J, Revilla M. Seasonal variability in gonad development in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) on the Basque coast (southeastern Bay of Biscay). *Mar Pollut Bull*. 2010;61(4–6):259–66.
87. CIIMAR. Caracterização do habitat preferencial do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) nas poças do intertidal rochoso da costa norte portuguesa com técnicas de análise multivariada. 2011
88. Diário da República. Portaria n.º 1228/2010 de 6 de Dezembro de 2010. 2010; nº 235.
89. Direção-Geral de Recursos Naturais S e SM. Tabela de Tamanhos Mínimos de Captura (Portaria nº 27/2001, de 15 de janeiro, com as alterações dadas pelas Portarias; nº 402/2002, de 18 de abril, nº 1266/2004, de 1 de outubro, nº 82/2011, de 22 de fevereiro, nº 119/2014 de 3 de junho, nº 170/2014, de 2. Portugal; 2016.
90. Diário, República. Portaria n.º 1228/2010. 2010
91. Da Costa, P.M., Loureiro, L., Matos AJF. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(1):278–94.
92. Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat [Internet]*. 2000 Oct;3(5):303–11.
93. Brahmi S, Touati A, Cadière A, Djahmi N, Pantel A, Sotto A, et al. First Description of Two Sequence Type 2 *Acinetobacter baumannii* Isolates Carrying OXA-23 Carbapenemase in *Pagellus acarne* Fished from the Mediterranean Sea near Bejaia, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2513–5.
94. Morrison BJ, Rubin JE, Goldmann D, Goossens H, Gyssens I, Harbarth S. Carbapenemase Producing Bacteria in the Food Supply Escaping Detection. *Conly J*, editor. *PLoS One*. 2015;10(5).
95. Rees EE, Davidson J, Fairbrother JM, St. Hilaire S, Saab M, McClure JT. Occurrence and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* in Oysters and Mussels from Atlantic Canada. *Foodborne Pathog Dis*. 2015;12(2):164–9.
96. Shumway SE, Parsons GJ. *Scallops : biology, ecology, and aquaculture*. Elsevier; 2006. 1460 p.
97. Taylor NGH, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends Ecol Evol*. 2011;26(6):278–84.
98. Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu C-Y, Schoolnik GK. Chitin Induces Natural Competence in *Vibrio cholerae*. *Science (80-)*. 2005;310(5755):1824–7.
99. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev [Internet]*. 2015;28(3):565–91.
100. Ciência, Tecnologia e Ensino Superior A e M-IP do M e da A. Despacho n.º 1851/2017. Diário da República nº 45/2017, Série II. 2017;3979–87. Disponível em: <https://dre.pt/home/-/dre/106547099/details/maximized?serie=II&day=2017-03-03&date=2017-03-01&drelid=106547088>
101. Manzoni GC, Schmitt JF. Cultivo de ostras japonesas *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia), na

Armação do Itapocoroy, Penha, SC. 2006; Disponível em: <http://www.avesmarinhas.com.br/bases ecologicas-capítulo 17.pdf>

102. ISO 6887-3:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products. 2003
103. Regulamento (CE) nº 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. j. of. da união eur. 2005
104. ISO 4833:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Colony-count technique at 30 degrees. 2003
105. ISO 21528-2:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count method.2004
106. ISO/TS 16649-3:2005 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli -- Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide.2005
107. ISO 16140:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods [Internet]. [cited 2017 Jul 15].2003
108. ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.2007
109. ISO 6888-3:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) -- Part 3: Detection and MPN technique for low numbers.2003
110. ISO 7937:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens -- Colony-count technique.2004
111. ISO 6579:2002 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of Salmonella spp. 2002
112. ISO 11290-1:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogens. Part 1. Detection method.2004
113. Instituto Português da Qualidade, Lisbon P. NP 3277-1: 1987 (1987) Microbiologia Alimentar – Contagem de bolores e leveduras (Food Microbiology – Moulds and yeasts count. 1st Part: incubation at 25°C. 1987
114. ISO 16649-2:2001 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli -- Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronid. 2001
115. ISO 6222:1999 - Water quality -- Enumeration of culturable micro-organisms -- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium. 1999
116. ISO 7899-2:2000 - Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 2: Membrane filtration method [Internet].2000
117. ISO 19250:2010 - Water quality -- Detection of Salmonella spp. 2010
118. Rex JH, Ferraro MJ, Anderson NL, Body BA et al. CLSI: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement. CLSI document. 2013. M100-S22 p.

119. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2012;18(3):268–81.
120. Byung Ha Park, Mi Seon Park, Bong Yeoul Kim, Sung Bum Hur, Seong Jun Kim. Culture of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in the Republic of Korea. 1988. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab706e/AB706E00.htm#TOC>
121. Diário da República- I Série A. Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto. 176:1–8.1998
122. Regulamento (CE) N. 178/2002, de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. 2002
123. Regulamento (CE) nº852/2004 de 29 de Abril de 2004. J Of da União Eur. 2004;3:1–25.
124. Regulamento (CE) nº 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. 2005;1–26.
125. Janete Bessa L, Dias VF, Mendes Â, Martins-Costa P, Ramos H, Martins Da Costa P, et al. How Growth Ability of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Is Affected by Abiotic Stress Factors. Open J Prev Med [Internet]. 2014;4(4):250–250.
126. Kaas RS, Friis C, Ussery DW AF. Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. BMC Genomics . 2012;13.
127. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev;26(4):822–80.
128. Instituto Nacional de Recursos Biológicos IP. Despacho nº 19961/2008, de 28 de Julho. Diário da República. 2008;144.
129. Choi S, Chu W, Brown J, Becker SJ, Harwood VJ, Jiang SC. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. Mar Pollut Bull. 2003;46(6):748–55.
130. Kühn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Franklin A, Finn M, et al. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. Example of an ongoing project within the European research programme. Int J Antimicrob Agents. 2000;14(4):337–42.
131. Assembleia da República. Lei n.º 58/2005, de 29 de Dezembro. 2005.
132. Directiva 2000/60/ce do parlamento europeu e do conselho de 23 de outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água. j of das comunidades eur. 2000; Disponível em: http://eurlex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:5c835afb-2ec6-4577-bdf8-756d3d694eeb.0009.02/doc_1&format=pdf
133. Martins VA, Dias JA, Laut LLM, Silva FS, Miranda P, Rubio B, et al. Distribuição de elementos traço e avaliação de risco de toxicidade de sedimentos da laguna de aveiro (nw portugal). Interações Homem - Meio nas zonas costeiras: Brasil/Portugal. Rio de Janeiro: Corbã; 2013. p. 103–9.
134. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, et al. Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. Eurosurveillance. 2016;21(6):30135.

135. Froelich BA, Noble RT. Factors affecting the uptake and retention of *Vibrio vulnificus* in oysters. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(24):7454–9.
136. Evan Ward J, Shumway SE. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J Exp Mar Bio Ecol*. 2004;300(1–2):83–130.
137. Antunes, F., Hinzmann, M., Lopes-Lima, M., Machado, J., Da Costa P. Association Between Environmental Microbiota and Indigenous Bacteria Found in Hemolymph, Extrapallial Fluid and Mucus of *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758). *Microb Ecol*. 2010;60(2):304–9.
138. Schmitt P, Rosa RD, Duperthuy M, de Lorgeril J, Bachère E, Destoumieux-Garzón D. The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front Microbiol*. 2012;3:160.
139. Bachre E, Rosa RD, Schmitt P, Poirier AC, Merou N, Charrire GM, et al. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol*. 2015;46(1):50–64.
140. Prieur D, Mevel G, Nicolas JL, Plusquellec A VM. Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*. 1990;28:277–352.
141. Rinkevich B, Müller WEG. Invertebrate Immunology. *Prog Mol Subcell Biol*. 1996;15:247.
142. Antunes F, Hinzmann M, Lopes-Lima M, Vaz-Pires P, Ferreira S, Domingues B, et al. Antibacterial effects of *Anodonta cygnea* fluids on *Escherichia coli* and enterococci multi-drug-resistant strains: environmental implications. *Toxicol Environ Chem*. 2014;96(6):880–9.
143. World Health Organization. Antimicrobial resistance global report on Surveillance. 2014; Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf
144. Surveillance report: Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>
145. Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. EFSA. 2013;11(12):3501. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2013.3501>
146. Balière C, Rincé A, Blanco J, Dahbi G, Harel J, Vogeleeer P, et al. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* in Shellfish-Harvesting Areas and Their Watersheds. *Front Microbiol*. 2015;6:1356.
147. Alves MS, Pereira A, Araújo SM, Castro BB, Correia ACM, Henriques I. Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Front Microbiol*. 2014;5:426.
148. Simões RR, Poirel L, Da Costa PM, Nordmann P. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. 2010;16(1):110–2.
149. Kieffer N, Poirel L, Bessa LJ, Barbosa-Vasconcelos A, Da Costa PM, Nordmann P. VIM-1, VIM-34, and IMP-8 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* strains recovered from a Portuguese river. Vol. 60. *American Society for Microbiology*; 2016. p. 2585–6.
150. Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos A-P, Mevius D, et al. Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options. *Clin Infect Dis*. 2013; 56(7):1030–7.
151. Martins Da Costa P, Vaz-Pires P, Bernardo F. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated

- in inflow, effluent and sludge from municipal wastewater treatment plants. *Urban Water J* 2007;4(4):275–81.
152. Martins da Costa, P., Vaz-Pires, P., Bernardo F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Res.* 2006;40(8):1735–40.
153. Nakata H, Kannan K, Jones PD, Giesy JP. Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography–mass spectrometry and fluorescence detection. *Chemosphere.* 2005;58(6):759–66.
154. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 2015 Dec ;13(12). Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2015.4329>

7 Anexos

Anexo I

Tabela S.1. Folha de bancada utilizada para o registo dos resultados das amostras de água. Na tabela estão indicadas as quantidades de amostra utilizadas para a deteção e/ou quantificação de cada um dos microrganismos estudados, bem como o método de inoculação das placas, as diluições da amostra, os meios de cultura utilizados e as temperaturas a que foram feitas as incubações.

Meios	Método	Diluição	Dia 1 (24h)	Dia 2 (48h)	Dia 3 (72h)
PCA 22 °C Microrganismos totais	Incorporação 1 ml	Direto			
		10 ⁻²			
		10 ⁻⁴			
PCA 37 °C Microrganismos totais	Incorporação 1 ml	Direto			
		10 ⁻²			
		10 ⁻⁴			
Agar marinho 21 °C Bactérias heterotróficas viáveis	Incorporação 1 ml	Direto			
		10 ⁻²			
		10 ⁻⁴			
TBX 44 °C <i>E. coli</i>	Incorporação 1 ml	Direto			
	Microfiltração*	10 ml			
		100 ml			
S-B 37 °C <i>Enterococcus spp.</i>	Incorporação 1 ml	Direto			
	Microfiltração*	10 ml			
		100 ml			
APT (50 mL) 37 °C 16-18h <i>Salmonella</i>	Microfiltração*	1 L	1 ml MKTTn 37 °C	Hektoen 37 °C	
			25 µl MSRV 41,5°C	Hektoen 37 °C	

Tabela S.2. Folha de bancada utilizada para o registo dos resultados das amostras de biofilme superficial, líquido intravalvar, hemolinfa e líquido celómico. Na tabela estão indicadas as quantidades de amostra utilizadas para a deteção e/ou quantificação de cada um dos microrganismos estudados, bem como o método de inoculação das placas, as diluições da amostra, os meios de cultura utilizados e as temperaturas a que foram feitas as incubações.

Meios	Método	Diluição	Dia 1 (24h)	Dia 2 (48h)	Dia 3 (72h)
PCA 30 °C Microrganismos totais	Incorporação 1 ml	Direto			
		10 ⁻²			
		10 ⁻⁴			
Agar marinho 21 °C Bactérias heterotróficas viáveis	Incorporação 1 ml	Direto			
		10 ⁻²			
		10 ⁻⁴			
TBX 44 °C <i>E. coli</i>	Incorporação 1 ml	Direto			
McConkey 37°C Enterobacteriaceae	Espalhamento 100 µl	Direto			
S-B 37 °C <i>Enterococcus spp.</i>	Incorporação 1 ml	Direto			

Tabela S.3. Folha de bancada utilizada para o registo dos resultados das amostras de conteúdo edível de ostras e de ouriços-do-mar. Na tabela estão indicadas as quantidades de amostra utilizadas para a deteção e/ou quantificação de cada um dos microrganismos estudados, bem como o método de inoculação das placas, as diluições da amostra, os meios de cultura utilizados e as temperaturas a que foram feitas as incubações.

Meios	Método	Diluição	Dia 1 (24h)	Dia 2 (48h)	Dia 3 (72h)	Dia 4 (96h)	Dia 5 (120h)	Dia 6 (144h)	Dia 7 (168h)
PCA 30 °C MO totais	Incorporação 1 ml	10 ⁻¹							
		10 ⁻³							
PCA 7 °C MO totais	Incorporação 1 ml	10 ⁻¹							
		10 ⁻³							
Agar marinho 21 °C Bactérias heterotróficas viáveis	Incorporação 1 ml	10 ⁻¹							
		10 ⁻³							
TBX 44 °C <i>E. coli</i>	Incorporação 1 ml	10 ⁻¹							
[Glutamato]²	10ml	10 ⁻¹ x 5	10 µL TBX						
Glutamato 37 °C <i>E. coli</i>	Incorporação 1 ml	10 ⁻¹ x 5	10 µL TBX						
		10 ⁻² x 5	10 µL TBX						
S-B 37 °C <i>Enterococcus spp.</i>	Incorporação 1 ml	10 ⁻¹							
BP-OVO 37 °C <i>Staphylococcus</i> <i>spp. coagulase +</i>	Espalhamento 100 µl	10 ⁻¹							
OGA 25 °C Bolores e leveduras	Espalhamento 200 µl	[10 ⁻¹] x 2							
	Espalhamento 100 µl	10 ⁻²							
TSC 37°C <i>Clostridium spp.</i> Anaerobiose	Incorporação 1ml	10 ⁻¹							
VRBG 37°C Enterobacteriaceae	Incorporação 1ml	10 ⁻¹							
MacConkey 37° C Enterobacteriaceae	Espalhamento 100µL	10 ⁻¹							
CFC 30 °C <i>Pseudomonas</i>	Espalhamento 100µl	10 ⁻¹							
APT/lote 37 °C 16-18h <i>Salmonella</i>	25g + 225 ml de APT	10 ⁻¹	25 µl MSRV 41,5°C	Hektoen 37°C	TSI 37°C				
			1 mL MKTTn 37°C	Hektoen 37°C	TSI 37°C				
Fraser I/lote 30°C <i>L. monocytogenes</i>	25g + 225 ml de Fraser I	10 ⁻¹	0,1 ml + 10 ml Fraser II 37°C		Esgotamento 10 µl Palcam 37 °C				

Anexo II

Tabela I.4 Variação sazonal da contaminação por *E. coli* do conteúdo edível de amostras de ostra recolhidas em diferentes zonas de produção de bivalves em Portugal. Estes dados foram recolhidos pelo IPMA no âmbito do plano de ação Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves. Os resultados aqui apresentados encontram-se disponíveis na página <http://www.ipma.pt/pt/pescas/bivalves/historico/micro/index.jsp> (consultada a 10 de Julho de 2017).

Julho 2016				
Local de Colheita	Zona de Produção	Espécie	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	Laboratório
Cacela	VT1	ostra-gigante	20	Lisboa
Alvor Povoação	POR2	ostra-gigante	45	Lisboa
Canal da Vaia	ESD1	ostra-portuguesa	20	Lisboa
Faralhão	ESD1	ostra-portuguesa	78	Lisboa
Fuzeta	FUZ1	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Vale da Lama	LAG	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Marchil	FAR1	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Largura	FAR2	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Quatro águas	TAV2	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Regueira Água Quente	OLH1	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Fortaleza	OLH2	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Ilhote Negro	OLH3	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Garganta	OLH4	ostra-gigante	< 18	Lisboa
Culatra	OLH5	ostra-gigante	20	Lisboa
Piscicultura	RIAV1	ostra	< 18	Lisboa
Piscicultura	RIAV1	ostra	< 18	Lisboa
Viveiros da Costa Nova	RIAV2	ostra	130	Lisboa
Ilha dos Puxadoiros	RIAV3	ostra	< 18	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra	< 18	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra	20	Lisboa
Novembro 2016				
Local de Colheita	Zona de Produção	Espécie	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	Laboratório
Montante da Ponte Eiffel	ELM	ostra-gigante	490	Lisboa
Canal da Vaia	ESD1	ostra-portuguesa	1700	Lisboa
Faralhão	ESD1	ostra-portuguesa	130	Lisboa
Roncão/Casa Nova	EMR	ostra-portuguesa	1700	Lisboa
Fuzeta	FUZ1	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Vale da Lama	LAG	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Cacela	VT1	ostra-japonesa/gigante	78	Olhão
Sagres/Cultura	L7b	ostra-japonesa/gigante	3500	Olhão
Parchal	POR3	ostra-japonesa/gigante	1300	Olhão
Quatro águas	TAV2	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Marchil	FAR1	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Largura	FAR2	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Regueira Água Quente	OLH1	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Fortaleza	OLH2	ostra-japonesa/gigante	290	Olhão
Ilhote Negro	OLH3	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Garganta	OLH4	ostra-japonesa/gigante	1300	Olhão
Culatra	OLH5	ostra-japonesa/gigante	2400	Olhão
Piscicultura	RIAV1	Ostra	490	Lisboa
Viveiros da Costa Nova	RIAV2	Ostra	230	Lisboa
Ilha dos Puxadoiros	RIAV3	Ostra	170	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	Ostra	45	Lisboa
Janeiro 2017				
Local de Colheita	Zona de Produção	Espécie	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	Laboratório
Montante da Ponte Eiffel	ELM	ostra-japonesa/gigante	4900	Lisboa
Montante da Ponte Eiffel	ELM	ostra-japonesa/gigante	690	Lisboa
Roncão	EMR	ostra-portuguesa	700	Lisboa
Cacela	VT1	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Cultura	L7b	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Fuzeta	FUZ1	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Canal da Vaia	ESD1	ostra-portuguesa	1700	Lisboa

Faralhão	ESD1	ostra-portuguesa	< 18	Lisboa
Vale da Lama	LAG	ostra-japonesa/gigante	20	Olhão
Parchal	POR3	ostra-japonesa/gigante	3500	Olhão
Quatro águas	TAV2	ostra-japonesa/gigante	78	Olhão
Marchil	FAR1	ostra-japonesa/gigante	3300	Olhão
Marchil	FAR1	ostra-japonesa/gigante	170	Olhão
Marchil	FAR1	ostra-japonesa/gigante	310	Olhão
Largura	FAR2	ostra-japonesa/gigante	110	Olhão
Regueira Água Quente	OLH1	ostra-japonesa/gigante	230	Olhão
Fortaleza	OLH2	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Ilhote Negro	OLH3	ostra-japonesa/gigante	270	Olhão
Garganta	OLH4	ostra-japonesa/gigante	330	Olhão
Culatra	OLH5	ostra-japonesa/gigante	270	Olhão
Piscicultura	RIAV1	ostra-japonesa/gigante	78	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	ostra-japonesa/gigante	330	Lisboa
Ilha dos Puxadoiros	RIAV3	ostra-japonesa/gigante	20	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra-japonesa/gigante	4900	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra-japonesa/gigante	78	Lisboa

Maio 2017

Local de Colheita	Zona de Produção	Espécie	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	Laboratório
Montante da Ponte Eiffel	ELM	ostra-japonesa/gigante	7000	Lisboa
Montante da Ponte Eiffel	ELM	ostra-japonesa/gigante	330	Lisboa
Canal da Vaia	ESD1	ostra-portuguesa	68	Lisboa
Casas Novas/Batalha	ESD2	ostra-portuguesa	130	Lisboa
Roncão	EMR	ostra-portuguesa	40	Lisboa
Vale da Lama	LAG	ostra-japonesa/gigante	45	Olhão
Castro Marim	GUA	ostra-japonesa/gigante	330	Olhão
Cacela	VT1	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Sagres/Cultura	L7b	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Fuzeta	FUZ1	ostra-japonesa/gigante	78	Olhão
Parchal	POR3	ostra-japonesa/gigante	130	Olhão
Quatro águas	TAV2	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Largura	FAR2	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Regueira Água Quente	OLH1	ostra-japonesa/gigante	170	Olhão
Fortaleza	OLH2	ostra-japonesa/gigante	78	Olhão
Garganta	OLH4	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Culatra	OLH5	ostra-japonesa/gigante	< 18	Olhão
Piscicultura	RIAV1	ostra-japonesa/gigante	330	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	ostra-japonesa/gigante	< 18	Lisboa
Ilha dos Puxadoiros	RIAV3	ostra-japonesa/gigante	20	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra-japonesa/gigante	130	Lisboa

Tabela I.4 Variação sazonal da contaminação por *E. coli* do conteúdo edível de amostras de bivalves recolhidas em diferentes zonas da Ria de Aveiro. Estes dados foram recolhidos pelo IPMA no âmbito do plano de ação Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves. Os resultados aqui apresentados encontram-se disponíveis na página <http://www.ipma.pt/pt/pescas/bivalves/historico/micro/index.jsp> (consultada a 10 de Julho de 2017).

Julho 2016				
Local de Colheita	Zona de Produção	Espécie	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	Laboratório
Piscicultura	RIAV1	ostra	< 18	Lisboa
Piscicultura	RIAV1	ostra	< 18	Lisboa
Moacha	RIAV1	berbigão	< 18	Lisboa
Viveiros da Costa Nova	RIAV2	ostra	130	Lisboa
Sul da Ponte da Barra	RIAV2	berbigão	230	Lisboa
Ilha dos Puxadoiros	RIAV3	ostra	< 18	Lisboa
Canal do Espinheiro	RIAV3	berbigão	20	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra	< 18	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra	20	Lisboa
Ponte de Ílhavo	RIAV4	berbigão	490	Lisboa
Novembro 2016				
Local de Colheita	Zona de Produção	Espécie	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	Laboratório
Piscicultura	RIAV1	ostra	490	Lisboa
Moacha	RIAV1	berbigão	130	Lisboa
Viveiros da Costa Nova	RIAV2	ostra	230	Lisboa
Sul da Ponte da Barra	RIAV2	berbigão	490	Lisboa
Ilha dos Puxadoiros	RIAV3	ostra	170	Lisboa
Canal do Espinheiro	RIAV3	berbigão	130	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra	45	Lisboa
Canal de Ílhavo	RIAV4	ostra	45	Lisboa
Ponte de Ílhavo	RIAV4	berbigão	790	Lisboa
Janeiro 2017				
Local de Colheita	Zona de Produção	Espécie	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	Laboratório
Piscicultura	RIAV1	ostra-japonesa/gigante	78	Lisboa
Moacha	RIAV1	berbigão	45	Lisboa
Moacha	RIAV1	amêijoa-japonesa	170	Lisboa
Moacha	RIAV1	amêijoa-macha	68	Lisboa
Moacha	RIAV1	longueirão	130	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	ostra-japonesa/gigante	330	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	berbigão	45	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	longueirão	130	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	amêijoa-boia	< 18	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	amêijoa-macha	1300	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	amêijoa-japonesa	790	Lisboa
Ilha dos Puxadoiros	RIAV3	ostra-japonesa/gigante	20	Lisboa
Canal do Espinheiro	RIAV3	berbigão	20	Lisboa
Canal do Espinheiro	RIAV3	amêijoa-japonesa	45	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra-japonesa/gigante	4900	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra-japonesa/gigante	78	Lisboa
Ponte de Ílhavo	RIAV4	berbigão	54000	Lisboa
Ponte de Ílhavo	RIAV4	berbigão	690	Lisboa
Ponte de Ílhavo	RIAV4	berbigão	2300	Lisboa
Canal de Ílhavo	RIAV4	amêijoa-japonesa	35000	Lisboa
Maio 2017				
Local de Colheita	Zona de Produção	Espécie	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	Laboratório
Piscicultura	RIAV1	ostra-japonesa/gigante	330	Lisboa
Moacha	RIAV1	berbigão	20	Lisboa
Moacha	RIAV1	amêijoa-macha	1100	Lisboa
Moacha	RIAV1	amêijoa-boia	5400	Lisboa
Moacha	RIAV1	amêijoa-boia	790	Lisboa
Moacha	RIAV1	amêijoa-japonesa	330	Lisboa
Moacha	RIAV1	longueirão	790	Lisboa
Costa Nova	RIAV2	ostra-japonesa/gigante	< 18	Lisboa
Sul da Ponte da Barra	RIAV2	longueirão	3500	Lisboa
Sul da Ponte da Barra	RIAV2	berbigão	790	Lisboa

Ponte da Barra	RIAV2	amêijoa-macha	45	Lisboa
Ilha dos Puxadoiros	RIAV3	ostra-japonesa/gigante	20	Lisboa
Canal do Espinheiro	RIAV3	amêijoa-macha	140	Lisboa
Canal do Espinheiro	RIAV3	amêijoa-boia	220	Lisboa
Canal do Espinheiro	RIAV3	berbigão	78	Lisboa
Corte das Freiras	RIAV4	ostra-japonesa/gigante	3300	Lisboa
Ponte de Ílhavo	RIAV4	berbigão	7900	Lisboa
Canal de Ílhavo	RIAV4	amêijoa-macha	110	Lisboa
Canal de Ílhavo	RIAV4	amêijoa-japonesa	170	Lisboa

Anexo III

Reprodução dos Anexos XIII e XIV do Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto, que estabelece as normas, os objetivos e os critérios de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos.

ANEXO XIII

Qualidade das águas do litoral ou salobras para fins aquícolas — águas conquícolas

Parâmetros	Expressão dos resultados	VMR	VMA	Método analítico de referência
<i>pH</i>	Escala de Sorensen		7-9	Electrometria (a medição efectua-se <i>in situ</i> ao mesmo tempo que a amostragem).
Temperatura	°C	A diferença de temperatura provocada por uma descarga não deve, nas águas conquícolas afectadas por essa descarga, ultrapassar em mais de 2°C a temperatura medida nas águas não afectadas.		Termometria (a medição efectua-se <i>in situ</i> ao mesmo tempo que a amostragem).
Cor (após filtração) ...	mg/l <i>Pt-Co</i>		Nas águas conquícolas a alteração de cor após filtração provocada por uma descarga não deve ultrapassar em mais de 100 mg/l <i>Pt-Co</i> a cor medida nas águas não afectadas.	Filtração através de membrana filtrante com uma porosidade média de 0,45 µm (método fotométrico com padrões da escala de <i>Pt-Co</i>).
Sólidos suspensos totais	mg/l		O aumento do teor em sólidos em suspensão provocado por uma descarga não deve, nas águas conquícolas afectadas por essa descarga, exceder em mais de 30 % o teor medido nas águas não afectadas.	Filtração através de membrana filtrante com uma porosidade de 0,45 µm, secagem a 105 °C e pesagem. Centrifugação (tempo mínimo cinco minutos, aceleração média de 2800 g a 3200 g), secagem a 105°C e pesagem.
Salinidade	‰	12-38	40 A variação de salinidade provocada por uma descarga não deve, nas águas conquícolas afectadas por essa descarga, exceder em mais de 10 % a salinidade medida nas águas não afectadas.	Conductimetria.
Oxigénio dissolvido ...	% de saturação	(¹) > 80	≥ 70 (valor médio) (¹) Se uma medição individual indicar um valor inferior a 70 %, as medições devem ser repetidas. Uma medição individual não pode indicar um valor inferior a 60 %, excepto quando houver consequências nocivas para o desenvolvimento dos povoamentos dos moluscos.	Método de Winkler. Método electroquímico.
Hidrocarbonetos de petróleo.			Os hidrocarbonetos não devem estar presentes nas águas conquícolas numa quantidade tal que: Produzam à superfície da água uma película visível e ou um depósito nas conchas; Provoquem efeitos nocivos nos moluscos.	Exame visual.

Parâmetros	Expressão dos resultados	VMR	VMA	Método analítico de referência
Compostos organo-halogenados ⁽¹⁾ (*)		O limite de concentração de cada composto na polpa do molusco deve ser tal que contribua, nos termos do artigo 30.º, para uma boa qualidade dos produtos conquícolas.	A concentração de cada substância nas águas conquícolas ou na polpa do molusco não deve ultrapassar um nível que provoque efeitos nocivos nos moluscos e nas suas larvas.	Cromatografia em fase gasosa após extracção por meio de solventes adequados e purificação.
Metais Prata (<i>Ag</i>). Arsénio (<i>As</i>). Cádmio (<i>Cd</i>). Crómio (<i>Cr</i>). Cobre (<i>Cu</i>). Mercúrio (<i>Hg</i>). Níquel (<i>Ni</i>). Chumbo (<i>Pb</i>). Zinco (<i>Zn</i>).	mg/l	O limite da concentração de cada elemento na polpa do molusco deve ser tal que contribua, nos termos do artigo 30.º, para uma boa qualidade dos produtos conquícolas.	Devem ser tidos em conta os efeitos sinérgicos destes metais.	Espectrometria atómica eventualmente precedida de uma concentração e ou extracção.
Substâncias que afectam o sabor do molusco.			Concentração inferior à concentração susceptível de deteriorar o sabor do molusco.	Exame gustativo dos moluscos quando se suspeitar da presença de tal substância.
Biotoxinas			PSP < 80 µg/100 g	(AOAC, 1980).
			DSP ausência	(Yasumoto, 1984).
			ASP < 20 µg/g	(AOAC, 1991).
Coliformes fecais	NMP/100 ml	≤ 300 na polpa do molusco e no líquido intervalar ⁽²⁾ .		Método de diluição, com fermentação em substratos líquidos, em pelo menos três tubos com três diluições. Subcultura dos tubos positivos em meio de confirmação. Contagem segundo NMP (número mais provável). Temperatura de incubação: 44°C 0,5°C.

⁽¹⁾ Trata-se de concentrações mínimas.

⁽²⁾ Enquanto não houver legislação específica relativa à protecção dos consumidores de produtos conquícolas, este valor deve ser imperativamente respeitado nas águas onde vivem moluscos directamente consumidos pelo homem.

(*) Consultar o anexo XIX.

PSP — *paralytic shellfish poisoning* (toxina paralisante).

DSP — *diarrhoeic shellfish poisoning* (toxina diarreica).

ASP — *amnesic shellfish poisoning* (toxina amnésica).

VMR — valor máximo recomendado.

VMA — valor máximo admissível.

ANEXO XIV

Frequência mínima de amostragem e de análise de águas do litoral e salobras para fins aquícolas — águas conculcolas

Parâmetros	Expressão dos resultados	Frequência mínima de amostragem e medição
<i>pH</i>	Escala de Sorensen	Trimestral.
Temperatura	°C	Trimestral.
Cor (após filtração)	mg/l <i>Pt-Co</i>	Trimestral.
Sólidos suspensos totais	mg/l	Trimestral.
Salinidade	‰	Mensal.
Oxigénio dissolvido	% de saturação	Mensal (com pelo menos uma amostra representativa do fraco teor em oxigénio no dia de colheita. Contudo, se se suspeitar de variações diurnas significativas, serão efectuadas pelo menos duas colheitas por dia).
Hidrocarbonetos de petróleo	mg/l	Trimestral.
Compostos organo-halogenados		Semestral.

Parâmetros	Expressão dos resultados	Frequência mínima de amostragem e medição
Metais	mg/l	Semestral.
Prata (<i>Ag</i>). Arsénio (<i>As</i>). Cádmio (<i>Cd</i>). Crómio (<i>Cr</i>). Cobre (<i>Cu</i>). Mercúrio (<i>Hg</i>). Níquel (<i>Ni</i>). Chumbo (<i>Pb</i>). Zinco (<i>Zn</i>).		
Substâncias que afectam o sabor do molusco		
PSP	µg/100 g	Quinzenal ⁽¹⁾ .
DSP	µg/100 g	Quinzenal ⁽¹⁾ .
ASP	µg/ g	Quinzenal ⁽¹⁾ .
Coliformes fecais	NMP/100 ml	Trimestral.

⁽¹⁾ Excepto em situações de marés vermelhas, em que o controlo tem de ser feito pelo menos semanalmente.

Avaliação da qualidade e da segurança microbiológica da ostra-do-Pacífico (*Crassostrea gigas*), a nível da produção primária, do Canal de Mira e do ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*) da Praia de Carreço e da Praia Norte em Viana do Castelo

Carla Rafaela Chiquelho da Silva

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO

